

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen
Aus dem
Institut für Pathologie und Neuropathologie

**Chemische Kanzerogenese im peripheren Nervensystem:
Charakterisierung präaligner und maligner Schwann-Zellen in
immunkompetenten und immundefekten BD Ratten**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Diana Lipp
aus Talgar/Kasachstan
2013

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Frau Priv.-Doz. Dr. med. A. Kindler-Röhrborn

2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. rer. nat. J. Thomale

Tag der mündlichen Prüfung: 10. April 2014

Meinen Eltern
und Tim

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	
1. Krebsentstehung – ein komplexer mehrstufiger Prozess	7
2. Suszeptibilität und Resistenz gegenüber der Tumorentstehung	8
3. Das Tiermodell der ENU-induzierten Kanzerogenese in Ratten der BD Stämme	9
4. Mechanismen von Suszeptibilität und Resistenz während der chemisch induzierten Neuroonkogenese der Ratte	11
5. Fragestellung	12
II. MATERIAL UND METHODEN	
II: 1 MATERIAL	
1. Chemikalien	14
2. Lösungen	16
3. Reagenzien für die Immunhistochemie	18
4. Geräte	19
5. Verbrauchsmaterialien	20
II: 2 METHODEN	
1. Gewebe	22
2. Herstellung, Fixierung und Färbung der Seriengefrierschnitte	22
3. Histologische Untersuchung der HE-Gefrierschnitte	22
4. Manuelle Mikrodisektion des verwendeten Gewebes	23
5. Amplifikation der DNA durch Polymerasekettenreaktion	23
6. Gelelektrophorese	24
7. Mutationsanalyse des PCR-Produktes durch enzymatische Spaltung und anschließende Fragmentlängenanalyse	24

8.	Visualisierung des gespaltenen Produktes	25
9.	Immunhistochemische Färbung Ngfr-exprimierender Schwann-Zellen	27
10.	Gewebebegewinnung an der Mikrodissektionsanlage	28

III. ERGEBNISSE

1.	Histomorphologische Untersuchung der <i>N. trigemini</i> thymektomierter mit ENU-behandelter BDIV Ratten	30
2.	Manuelle Mikrodissektion der Hirn-Nerven-Grenze zur Detektion <i>Neu/ErbB2</i> -mutierter Schwann-Zellen in den <i>N. trigemini</i> thymektomierter mit ENU-behandelter BDIV Ratten	33
3.	Lasergestützte Mikrodissektion präaligner Schwann-Zellen nach morphologischen Kriterien in den <i>N. trigemini</i> thymektomierter und euthymischer ENU-behandelter BDIV Ratten zur Detektion der <i>Neu/ErbB2</i> Mutation	37
4.	Lasergestützte Mikrodissektion Ngfr exprimierender Schwann-Zellen in den <i>N. trigemini</i> thymektomierter sowie euthymischer BDIV Ratten zur Untersuchung des Mutationsstatus des <i>Neu/ErbB2</i> Gens	39
5.	Lasergestützte Mikrodissektion Ngfr exprimierender Schwann-Zellen in den MPNST thymektomierter BDIV Ratten zur Untersuchung des Mutationsstatus des <i>Neu/ErbB2</i> Gens	43
6.	Histomorphologische Untersuchung von MPNST, in unterschiedlichen Rattenstämmen, bzw. Hybriden, unter dem Aspekt der Ngfr Expression	45
7.	Mikrodissektion Ngfr stark und schwach exprimierender Schwann-Zellen in den MPNST von (BDIV x BDIX) x BDIX Ratten und Detektion von mutierten Allelen des <i>Neu/ErbB2</i> Gens	47

IV.	DISKUSSION	
1.	Charakterisierung der prämaligen und malignen Schwann-Zellen anhand der Histomorphologie und der <i>Neu/ErbB2</i> Mutation	50
2.	Charakterisierung der prämaligen und malignen Schwann-Zellen anhand der Expression des Ngfr und der Anwesenheit der <i>Neu/ErbB2</i> Mutation	54
V.	ZUSAMMENFASSUNG	60
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	61
VII.	ANHANG: Abkürzungen	67
VIII.	DANKSAGUNGEN	69
IX.	LEBENS LAUF	70

I. EINLEITUNG

1. Die Krebsentstehung – ein komplexer mehrstufiger Prozess

Krebserkrankungen sind die zweithäufigste Todesursache weltweit (Ferlay et al., 2010). Deutschlandweit gab es im Jahr 2008 fast 500000 maligne Neuerkrankungen (Kaatsch et al., 2012). Die Fünfjahresüberlebensrate der Neuerkrankten lag in den Jahren 2007 - 2008 bei Männern bei 59 % bzw. bei Frauen bei 64 % (Kaatsch et al., 2012).

Die Vermeidung der Tumorerkrankungen durch Präventionsmaßnahmen, die Früherkennung von Tumoren sowie eine zielgerichtete Therapie der Krebserkrankungen sollten die Tumorzinzidenz senken und die Heilungschancen beträchtlich erhöhen. Eine wichtige Voraussetzung dafür besteht in einer Aufschlüsselung zellulärer und molekularer Mechanismen bei der Onkogenese.

Während der Kanzerogenese kommt es schrittweise zu einer Aktivierung wachstumsaktivierender Protoonkogene und zu einer Hemmung wachstumsunterdrückender Tumorsuppressorgene durch unterschiedliche Mutationen (Weinberg, 1995; Brown, 1997).

Protoonkogene kodieren für Proteine, die über Signalübertragungswege die physiologische Zellvermehrung steuern. Onkogene stellen dominant agierende mutierte Gegenstücke der Protoonkogene dar, die zu einer ungehinderten Zellproliferation und somit zur Entartung der Zelle führen können (Weinberg, 1995). Die häufigsten aktivierten humanen Onkogene sind das *ERBB2* Onkogen bei Mamma- und Ovarialkarzinomen, Mitglieder der *RAS* Familie z.B. *K-RAS* bei Bronchial- und Kolonkarzinomen sowie *MYC* Onkogene, die häufig bei Mamma- und Ösophaguskarzinomen sowie einigen Leukämieformen zu finden sind (Hung und Lau, 1999; Wiesmuller und Wittinghofer, 1994).

Tumorsuppressorgene agieren dahingegen rezessiv, d. h., dass beide Kopien inaktiviert sein müssen, wenn sie Effekte auf die Tumorentstehung ausüben sollen (Weinberg, 1995). Unter physiologischen Bedingungen stoppen sie unter anderem die Zellvermehrung, indem sie die Proliferation hemmen und die Apoptose fördern (Weinberg, 1995). Inaktivierte Allele von Tumorsuppressorgenen in der Keimbahn bilden die Grundlage für direkt

vererbte Formen der Krebsentstehung - die Tumorsuszeptibilitätssyndrome (Kinzler und Vogelstein, 1997).

Beispielsweise wird das erbliche Mammakarzinom häufig durch Keimbahnmutationen der Tumorsuppressorgene *BRCA1* und *BRCA2* verursacht (Zheng et al., 2000), das erbliche Retinoblastom durch ein mutiertes *RB* Gen (Bartek et al., 1997) und erbliche Kolonkarzinome durch Mutationen des *APC* Gens (Bresalier, 1997).

Mutierte Tumorsuppressorgene in der Keimbahn sind nur für einen kleinen Teil aller Tumorerkrankungen verantwortlich, da > 90% der malignen Tumoren sporadisch, d.h. ohne eine familiäre Häufung entstehen (Ponder, 1990).

2. Suszeptibilität und Resistenz gegenüber der Tumorentstehung

Vieles deutet jedoch darauf hin, dass das unterschiedliche individuelle menschliche Risiko an einem sporadisch entstehenden Tumorleiden zu erkranken durch ein Zusammenspiel exogener und genetischer Faktoren bedingt ist. So erkrankten z.B. nur ca. 10% der Zigarettenraucher an einem Bronchialkarzinom, während mehr als 90% der Bronchialkarzinome bei Männern und mehr als 70% bei Frauen durch das Zigarettenrauchen entstehen (Kaatsch et al., 2012). Die Tatsache, dass nicht jeder Exponierte ein entsprechendes Malignom ausbildet, spricht für die genetische Komponente bei der Tumorentstehung.

Da das Zusammenspiel mehrerer weder hinreichender noch notwendiger Genvarianten das genetische Krebsrisiko determiniert, ist es schwierig die einzelnen dafür verantwortlichen Gene zu identifizieren. Dazu kommt noch, dass die Exposition gegenüber Kanzerogenen aus der Umwelt bei Menschen sehr unterschiedlich und im Allgemeinen nicht dokumentiert ist.

Um der genetischen Komponente bei der Tumorentstehung auf den Grund gehen zu können, bieten sich Tiermodelle an, da hier ingezüchtete, genetisch weitestgehend identische Tiere unter kontrollierten Bedingungen gehalten werden und gezielt gegenüber Karzinogenen exponiert werden können.

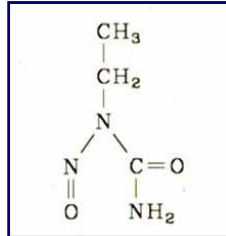
3. Das Tiermodell der ENU-induzierten Kanzerogenese in Ratten der BD Stämme

Die Inzuchtrattenstämme BDIX und BDIV eignen sich dazu Gene zu identifizieren, die das Tumorrisiko beeinflussen, da ihre Empfindlichkeit gegenüber der chemisch induzierten Kanzerogenese im Nervensystem sehr unterschiedlich ist (Druckrey, 1973).

So ist der BDIX Stamm extrem empfindlich gegenüber der Entstehung maligner Nervenscheidentumoren (MPNST), während der BDIV Stamm fast vollständig resistent ist (Druckrey, 1973).

Zur Initiation der Kanzerogenese dient eine einmalige subkutane Gabe des Karzinogens Ethylnitrosoharnstoff (ENU) (80 µg/g Körpergewicht) am 1. Postnataltag der Ratte (Abb.1). In wässriger Lösung zerfällt ENU zu einem hochreaktiven Ethyldiazonium – Ion - Intermediat, ohne dass eine enzymatische Aktivierung notwendig ist. Obwohl dieses Produkt mit der DNA aller Gewebe reagiert und dabei kanzerogene DNA - Alkylierungsprodukte bildet, kommt es hauptsächlich zur Bildung von Tumoren des Nervensystems (Druckrey, 1973).

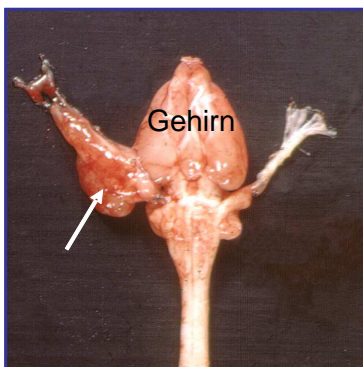
Subkutane Injektion des Kanzerogens N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff
am ersten Postnataltag



BDIX Ratte



Entwicklung von MPNST in
85 % der BDIX Ratten



BDIV Ratte



nahezu vollständige Resistenz
der BDIV Ratten gegenüber
der Entstehung von MPNST

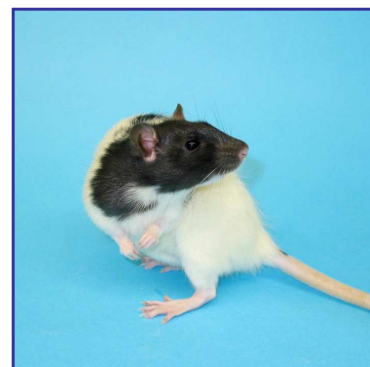


Abb. 1 Auswirkungen der ENU - Applikation am ersten Postnataltag auf die Entwicklung von malignen Nervenscheidentumoren (MPNST) der eng miteinander verwandten Rattenstämme BDIV und BDIX (nach Kölsch, modifiziert)

4. Mechanismen von Suszeptibilität und Resistenz während der chemisch induzierten Neuroonkogenese der Ratte

Ca. 20 Tage nach der Exposition mit Ethylnitrosoharnstoff (ENU) ist eine erhöhte Schwann-Zellzahl mit einer höheren Rate von Mitosen in den *N. trigemini* ENU - behandelten Ratten nachzuweisen. Kurz danach entwickeln sich Gruppen von kleinen unregelmäßig verteilten Schwann-Zellen mit polymorphen Kernen, die hauptsächlich an der Hirn-Nervengrenze der *N. trigemini* lokalisiert sind und die Gewebearchitektur der Nerven auflockern (Svenberg et al., 1975). Diese Zellen werden als prä maligne angesehen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Schwann-Zellen eine T: A \rightarrow A: T Transversionsmutation des Nukleotids 2012 in der Transmembranregion des *Neu/ErbB2* Onkogens tragen. Diese Mutation ist bereits 7-14 Tage nach ENU - Exposition nachweisbar (Nikitin et al., 1991). Das Protoonkogen kodiert für eine Rezeptortyrosinkinase. Wenn das *Neu/ErbB2* Gen die oben beschriebene Transversionsmutation aufweist, ist die Tyrosinkinase auch ohne Bindung eines Liganden aktiviert. Durch eine entsprechende Signaltransduktionskaskade resultiert daraus eine Meldung von proliferationsfördernden Signalen an den Zellkern und ein ungehindertes Wachstum der Schwann-Zellen (Bargmann et al., 1986).

Alle malignen durch ENU - induzierten Nervenscheidentumore (MPNST) tragen die *Neu/ErbB2* Gen Mutation, so dass davon ausgegangen werden muss, dass sie aus den anfänglich prä malignen Schwann-Zellen entstanden sein müssen. Die *Neu/ErbB2* Gen Mutation bietet die Möglichkeit prä maligne Schwann-Zellen während der frühen Stadien der Kanzerogenese zweifelsfrei identifizieren und verfolgen zu können. Dies ist besonders vorteilhaft im Gegensatz zur chemisch induzierten Kanzerogenese in anderen Organen, wo man während der Verlaufsbeobachtung allein auf histomorphologische Veränderungen angewiesen ist (Korkola und Archer, 1999).

Da die *Neu/ErbB2*-mutierten Schwann-Zellen sich hauptsächlich an der Hirn–Nerven–Grenze des *N. trigeminus* befinden, erleichtert dies darüber hinaus die Identifizierung und Isolierung dieser Zellen in Gewebeschnitten.

Während die Fraktion der mutierten Schwann-Zellen in der BDIV Ratte ca. ab dem Tag 100 nach Kanzerogenexposition kleiner wird und nach dem Tag 260 keine mutierten Zellen mehr nachweisbar sind, steigt ihr Anteil in der BDIX Ratte bis zum Tag 180 an, so dass alle Tiere bis zum Tag 260 aufgrund der Ausbildung von

malignen Nervenscheidentumoren (MPNST) getötet werden mussten (Kindler-Rohrborn et al., 2000). Als eine Erklärungsmöglichkeit des Resistenzmechanismus der BDIV Ratte wurde damals die Elimination der *Neu/ErbB2*-mutanten Zellen durch das Immunsystem diskutiert (Kindler-Rohrborn et al., 2000). Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass die Anzahl von Immuneffektorzellen (Makrophagen, Leukozyten, T-Helferzellen und zytotoxischer T-Zellen) in den Nerven ENU-behandelter Tiere beider Stämme (BDIV und BDIX) im Vergleich zu den unbehandelten Ratten signifikant erhöht war (Gering et al., 2006). Da die Immuneffektorzellen in beiden Stämmen in gleicher Anzahl nachweisbar waren, wurde eine unterschiedliche stammspezifische Interaktion zwischen den prämaligen Schwann-Zellen und den Immuneffektorzellen als möglicher resistenzvermittelnder Mechanismus der BDIV Ratte diskutiert (Gering et al., 2006).

5. Fragestellung

Um eine mögliche Beteiligung von T-Lymphozyten an der Elimination von *Neu/ErbB2*-mutanten Schwann-Zellen zu untersuchen, wurde den Ratten des resistenten BDIV Stamms vor der ENU-Behandlung am 1. Postnataltag der Thymus entfernt, um die Reifung von T-Lymphozyten zu verhindern. Die thymektomierten Tiere entwickelten in ca. 20% der Fälle MPNST des *N. trigeminus* (Marx et al., 2009). Dies bestätigte die Vermutung, dass das Immunsystem bei Suszeptibilität und Resistenz gegenüber der Entstehung ENU-induzierter MPNST eine Rolle spielt. Die T-Lymphozyten scheinen jedoch nicht die einzigen beteiligten Zellen zu sein.

Etwa die Hälfte der in thymektomierten BDIV Ratten entstandenen MPNST wiesen nicht die *Neu/ErbB2* Mutation auf.

Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob in den *N. trigemini* dieser Tiere in Abwesenheit von T-Lymphozyten auch prämaligene Schwann-Zellen, die andere proliferationsfördernde Mutationen aufweisen, zur Entstehung von MPNST führen könnten, diese Schwann-Zellen jedoch in immunkompetenten BDIV Tieren zusammen mit *Neu/ErbB2*-mutanten Schwann-Zellen eliminiert werden. Dies sollte in meiner Arbeit untersucht werden.

In diesem Zusammenhang sollten in meiner Arbeit prä-maligne und maligne Schwann-Zellen in den *N. trigemini* immunkompetenter und thymektomierter BD Ratten nach histomorphologischen Kriterien und mit Hilfe molekularer Marker (Mutation im *Neu/ErbB2* Gen, Expression des niedrig affinen Nervenwachstumsfaktorrezeptors (Ngfr) charakterisiert werden.

Im Rahmen der Suche nach Markerproteinen hatte unsere Arbeitsgruppe gezeigt, dass Schwann-Zellen mit entarteter Morphologie während der ENU induzierten Kanzerogenese bei BDIX und BDIV Ratten sowie die daraus resultierenden MPNST den niedrig affinen Nervenwachstumsfaktorrezeptor (Ngfr) exprimieren. Darüber hinaus stellt dieses Protein während der Entwicklung des Nervensystems einen Marker für unreife Schwann-Zellen dar (Jessen und Mirsky, 2005).

Von besonderem Interesse in meiner Arbeit war, ob und inwieweit die Ngfr-Expression mit der Morphologie der prä-malignen und malignen Schwann-Zellen bzw. mit der Anwesenheit der *Neu/ErbB2* Mutation, die primär als Marker für diese Zellen etabliert war, korreliert.

Durch diese Untersuchungen sollten Aufschlüsse über die molekularen und zellulären Mechanismen, die das unterschiedliche Tumorrisiko der BD Ratten bedingen, erhalten werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

II. 1 MATERIAL

1. CHEMIKALIEN

Name	Produkt-Nummer	Firma
10xTaq-Puffer	Enthalten in Taq DNA Polymerase, M0267L	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
ABComplex/HRP	ZUCO12-008	Zytomed Systems, Berlin
Agarose NEEO Ultra Roti®gerose	2267.4	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS).	161-0700	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Ampuwa-Wasser	40676.00.00	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Azeton	1.00014.2511	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid-Acrylamid (19:1)	10679	Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA
Borsäure	5935.2	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau, reinst	15375	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA
Zitronensäure	244	Merck, Darmstadt
Corbit-Balsam		Hecht, Kiel-Hassee
DAKO-Pen	S 2002	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Di-Natrium-hydrogen-Phosphat	6580.0400	Merck, Darmstadt
dNTP-Mix 2mM	R0249	Fermentas, Burlington, ON, Kanada

Name	Produkt-Nummer	Firma
EDTA	E-5134	Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA
Essigsäure 96%	1.00062.2511	Merck, Darmstadt
Ethanol	1.00983.2511	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid-Lösung 1%	21251	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
NEU	N3385	Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA
Formaldehyd, 37%	103999.1000	Merck, Darmstadt
Formamid	S4117	Oncor, Gaithersburg, MD, USA
Längenstandard, 100bp DNA Leiter Generuler®	SM 0241	Fermentas, Burlington, ON, Kanada
Mayer's Hämaunlösung	1. 09249.500	Merck, Darmstadt
Mineralöl	M-5904	Sigma Chemical Company
NaOH	1.06482.1000	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	1.06392.5000	Merck, Darmstadt
PBS-Trockensubstanz ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ (Dulbecco)	L182-10	Biochrom AG, Berlin
Primer <i>Neu</i> -mut-F ¹ und <i>Neu</i> -mut-R ²		Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Restriktionsenzym Restriction endonuclease MnlI, 300U/μl	ER1071	Fermentas, Burlington, ON, Kanada

¹ Sequenz: 5' GCCAGCCCGGTGACATTCATCATTG 3'

² Sequenz: 5' GCAGCCTACGCATCGTATACTTCCG 3'

Name	Produkt-Nummer	Firma
Salpetersäure 65%	1.00456.2500	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	7908.2	Roth
Taq-Polymerase 5U/µl	M0267L	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
TEMED	161-0801	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Tissue-Tek® O.C.T.TM Compound	4583	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande
Tris Base	1.08382.2500	Merck, Darmstadt
Trockeneis		Hauseigene Produktion des Uniklinikums Essen
Xylene Cyanol FF	38505	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Xylol, reinst	KMF. 30-060.9025	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar

2. Lösungen

2.1. 10-fach-Ladepuffer für Silber- und Agarosegele

Reagenz	Menge
EDTA 0,5 M	0,5 ml
Xylene Cyanol FF	6 mg
Bromphenolblau	6 mg
In Formamid lösen	24,5 ml

2.2. 50-fach TAE-Puffer (pH 8,4)

Reagenz	Menge
Tris Base	242 g
Essigsäure	57,1 ml
0,5 M EDTA	100 ml
A. bidest	ad 1000 ml

2.3. 5-fach TBE-Puffer (pH 8,4)

Reagenz	Menge
Tris Base	270 g
Borsäure	137,5 g
EDTA	18,6 g
A. bidest	ad 5000 ml

2.4. dNTP-Lösung 40mM

Reagenz	Menge
dATP (100 mM)	40 µl
dTTP (100 mM)	40 µl
dGTP (100 mM)	40 µl
dCTP (100 mM)	40 µl
Ampuwa-Wasser	240 µl

3. Reagenzien für die Immunhistochemie

Name	Produkt- Nummer	Firma	Verdünnung
Proteinblock (Blocking Solution)	ZUC007-100	Zytomed Systems, Berlin	
Maus anti Kaninchen Ngfr- Antikörper	N3908-2ML	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim	1:500
Kaninchen-anti- Maus Laminin- Serum	-	Geschenk von Prof. A Vaheri, Helsinki, Finnland	1:100
Ziege-anti- Kaninchen IgG- Antikörper	111-066-144	Jackson, Immuno Research, Laboratories INC	1:500
ABComplex/HRP- Konjugat	ZUC012-008	Zytomed Systems, Berlin	
HRP-DAB Kit Broad Spectrum (Substrat Puffer, DAB Chromogen- Konzentrat)	HRP008 DAB	Zytomed Systems, Berlin	

4. Geräte

Name	Produkt-Nummer	Firma
Gießrahmen für Polyacrylamidgele	S2 Casting Boot	Life Technologies (Gibco BRL), Gaithersburg, MD, USA
Analysewaage	LC820-OCE	Sartorius, Göttingen
Binokular-Mikroskop	HBO 50/AC Axiovert25	Zeiss, Oberkochen
Gelelektrophorese-Kammer (Sequencing, Gelelectrophoresis Apparatus)	Model S2	Life Technologies (Gibco BRL), Gaithersburg, MD, USA
Agarosegelkammern		Biometra Medizinische Analytik GmbH, Göttingen
Geltrockner Drygel Sr.	SE 1160	Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
Haifischzahnkamm 67 well Mylar	49-21-123	Labtech International GmbH, Burkhardtdorf
Heizrührer IKA-Combimag	Typ RCT	Janke & Kunkel KG, Staufen i. Breisgau
Kryostat Microm	Typ HM 560	Microm GmbH, Walldorf
Mikrodissektionsanlage	Typ P.A.L.M. MicroBeam	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Mikroskop	BX51TF	Olympus, Japan
Mikrowellenherd	NN 3256	Panasonic, Japan
Pipette Eppendorf 0,1-10µl	Reference®(Variabel)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Gilson2-200µl/100-1000µl	Pipetman®P	Gilson, Middleton, WI, USA

Name	Produkt-Nummer	Firma
Präzisionswaage	AC120S	Sartorius, Göttingen
Spannungsgerät Electrophoresis Powersupply	PH-st 500	Biotec Fischer GmbH, Reiskirchen
Thermocycler Biometra®	Tpersonal 20	Biometra Medizinische Analytik GmbH, Göttingen
UV- Transilluminator	GelDoc 1000	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Zentrifuge	Megafuge 3.0RS	Heraeus Instruments, Osterode

5. Verbrauchsmaterialien

Beschreibung	Produkt-Nummer	Firma
Alufolie	1-6612	neoLab, Heidelberg
Deckgläser	BB 024040A1	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Falcon Polystyren- Röhrchen 12x75 mm	352235	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Falcon Polystyren- Röhrchen, 15 ml	2095	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Kryoröhrchen Cryovial® mit Außengewinde	T309-2	Simport Plastics, Beloell, Qc, Kanada
Metallkanülen Terumo® 21G und 27G	NN-21381R35 bzw. NN-2719R35	Terumo Deutschland, Eschborn
Mikropipetten Delbrück Na- Hep 20 µl	BRA 708660	Brand GmbH und Co KG, Wertheim
Objektträger, geschnitten mit Mattrand	11102	Engelbrecht, Edermünde
Objektträger mit Folie: PALM MembraneSlides	1440-1000	P.A.L.M. Microlaser Technologies, Bernried

Beschreibung	Produkt-Nummer	Firma
PCR-Tubes, 0,5 ml	710913, 710905	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
AdhesiveCap 500 µl opaque	415190-9201-000	P.A.L.M. Microlaser Technologies GmbH, Bernried
Pipettenspitzen Gilson Tupac yellow (200 µl) und blue (1000 µl)	G 23810, G 23818 A	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettenspitzen Safeguard 10 µl, 200 µl, 1000 µl	81-1011, 81-1040, 81- 1050	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	0030 120.086, 0030 120.094	Eppendorf, Hamburg
SuperFrost-Objektträger, Menzel-Gläser®	J 1800AMNZ	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Whatman-Papier Chromatography Paper 3	3003-911	Whatman plc, Brentford, UK

II. 2 METHODEN

1. Gewebe

Die intrakranialen Anteile der *N. trigemini* ENU behandelter, am Postnataltag 1 thymektomierter und euthymischer BDIV Ratten sowie MPNST von BDIV Ratten, (BDIV x BDIX) F₂, (BDIV x BDIX) x BDIX Hybriden und von kongenen BDIX.BDIV-*Mss4a* Tieren waren nach Schockfrostung in flüssigem Stickstoff bei -80°C in Gefrier Röhrchen bis zur weiteren Verarbeitung gelagert worden.

2. Herstellung, Fixierung und Färbung der Seriengefrierschnitte

Die einzelnen Nerven wurden vor dem Schneiden in einer Box mit Trockeneis bereitgelegt und anschließend auf den Probenhaltern des Cryomikrotoms in vorgekühltem Tissue-Tec eingebettet. Sie wurden mit einem Dickevorschub von 8 µm longitudinal geschnitten.

Die Gefrierschnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet, am nächsten Tag zu je 2 Objektträgern in Alufolie verpackt, und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert. Jeweils ein Objektträger pro Nerv wurde in einer Küvette mit Meyer's Hämalaunlösung 1 min gefärbt. Die überschüssige Lösung ließ sich durch Spülen unter fließendem Leitungswasser entfernen. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Nachdem die Schnitte getrocknet waren, wurde jeweils auf einen Objektträger ein Tropfen Corbit-Balsam aufgebracht und der Schnitt mit einem Deckglas abgedeckt. Für die Mikrodissektion wurden die Nerven frisch geschnitten und auf membranbeschichtete Objektträger aufgebracht. Diese wurden nicht eingedeckt.

3. Histologische Untersuchung der HE-Gefrierschnitte

Die mit Meyer's Hämalaunlösung gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops bei unterschiedlichen Vergrößerungen auf histologische Auffälligkeiten im Hinblick auf die Anwesenheit prämaligner Vorläuferzellen untersucht. Anschließend wurden alle Schnitte nach histologischen Kriterien grob sortiert. Im weiteren Verlauf wurden die Schnitte fotografiert, um eine genauere Sortierung zu ermöglichen. Es wurde eine Skala von 1-4 festgelegt, wobei die 1 Abwesenheit prämaligner Zellen und 4 das Vorhandensein eines malignen Nervenscheidentumors (MPNST) bedeutete (siehe Tabelle Seite 35-36).

4. Manuelle Mikrodisektion des verwendeten Gewebes

Um festzustellen, ob im Bereich der Hirn-Nervengrenze der Trigemiusnerven ENU behandelte Tiere mutierte Allele des *Neu/ErbB2* Gens vorhanden waren, sollte das zu analysierende Gewebe jeweils aus den gleichen Nervenregionen verwendet werden. Da bereits in früheren Studien gezeigt wurde, dass sich die prämaligen, *Neu/ErbB2*-mutanten Zellen, vor allem im Bereich des Hirn-Nervenübergangs befinden, wurde dieses Gebiet für die Analysen gewählt. Unter binokularer Sicht wurde mit Hilfe einer sterilen Kanüle ein circa 3 mm breiter dem Hirn angrenzender Nervenbereich mikrodiseziert und auf den Boden eines mit 10 µl 50 mM NaOH befüllten PCR-Gefäßes überführt. Der Ansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl bedeckt und bei 90°C 20 min inkubiert.

5. Amplifikation der DNA durch Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurde ein 129 bp langes DNA-Fragment des *Neu/ErbB2* Gens amplifiziert, welches das potentiell mutierte Nukleotid 2012 enthält und für die Transmembranregion der *Neu/ErbB2* Gen Rezeptor-Tyrosinkinase kodiert.

PCR-Mix:

Folgende Reagenzien wurden in den für jede Probe angegebenen Mengen zum PCR-Mix gemischt und zu den Gewebeproben dazugegeben:

Reagenz	Menge
10 × Taq-Puffer	10 µl
Taq-Polymerase 5 U/ml	0,8 µl
dNTPs (je × 25 µM)	8 µl
Primer 1 (402E)	7,5 µl
Primer 2 (412)	7,5 µl
Aqua bidest	66 µl

Je 22 µl des PCR-Mixes wurden zu 3 µl, der in 50mM NaOH gelösten Gewebeprobe gegeben. Der Ansatz wurde mit 2 Tropfen Mineralöl bedeckt und unter folgenden Bedingungen im Thermocycler amplifiziert:

Schritt	Bedingungen	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	3 min 95 °C	1
Denaturierung	1 min 94 °C	55
Anlagerung	1 min 64 °C	55
Extension	1 min 72 °C	55
Extension	10 min 72 °C	1

6. Gelelektrophorese

Folgende Reagenzien wurden in einem Erlenmeyerkolben gemischt um ein 3%iges Agarosegel herzustellen:

Reagenz	Menge
Agarose	2,4 g
50-fach TAE Puffer	1,6 ml
A. bidest	80 ml

Nach dem Erhitzen im Mikrowellenherd wurden 3 µl Ethidiumbromidlösung dazu gegeben und durch Schwenken verteilt. Das Gesamtgemisch wurde in einen Gießrahmen mit Kamm (meist mit 12 Taschen) gegossen. 5 µl des PCR-Produktes wurden mit 1 µl 6 × Probenpuffer vermischt und nach Aushärten des Gels in die durch den Kamm entstandenen Gel-Taschen pipettiert. Die Größe des PCR-Produktes wurde anhand eines DNA-Längenstandarts „Generuler“ (siehe Seite 15), der in einer der Gelspuren gelaufen war, abgeschätzt.

Die Elektrophorese erfolgte für circa 30 min bei 80 Volt. Anschließend wurde das Gel auf dem UV-Tisch analysiert und fotografiert. Wenn genug PCR-Produkt vorhanden war, wurden die Proben mit dem Restriktionsenzym *MnII* verdaut.

7. Mutationsanalyse des PCR-Produktes durch enzymatische Spaltung und anschließende Fragmentlängenanalyse

Bei der PCR mit den Primern 402E/ 412 entstand ein 129 bp langes DNA-Fragment unabhängig davon, ob das *Neu/ErbB2* Gen mutiert war oder nicht. Wenn die durch ENU induzierte T:A → A:T Mutation vorhanden war, entstand eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *MnII* (Erkennungssequenz: 5' – CCTC(N)7. Während das Wildtyp PCR-Produkt nicht von diesem Enzym geschnitten wurde,

spaltete *MnII* das die Mutation tragende Allel, so dass ein 104 bp großes Fragment entstand. Zur Detektion und Quantifizierung mutierter Allele wurden 5 µl des PCR-Ansatzes mit 5 µl *MnII* - Mix 2,5 h bei 37 °C im Heizblock inkubiert und 10 min auf 72 °C erhitzt. *MnII*-Mix (für ca. 20 PCR-Proben) beinhaltete: 10 µl 300 U/µl *MnII*, 30 µl 10 × *MnII*-Puffer und 110 µl aqua bidest.

8. Visualisierung des gespaltenen Produktes

Die Produkte wurden nach ihrer enzymatischen Spaltung und der Trennung auf einem 6%igen Polyacrylamidgel mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht.

Das 6 %-ige Polyacrylamidgel wurde wie folgt hergestellt

Reagenz	Menge
5 × TBE	16 ml
40 % Acrylamid (19:1)	12 ml
A. bidest	52 ml
TEMED	80 µl
20 % APS	160 µl

Mittels Abstandhalter und Gießrahmen wurden die gereinigten Glasplatten so aufeinander fixiert, dass ein 0,4 mm breiter Hohlraum entstand. Dieser wurde mit 70 ml Polyacrylamidlösung befüllt und ein Haifischzahnkamm mit der stumpfen Seite zwischen die Platten geschoben. Anschließend sollte das Gel ca. 2 Stunden polymerisieren. Nachdem die Glasplatten mit dem polymerisierten Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt worden waren, wurden die Pufferkammern mit 1 × TBE aufgefüllt. Danach wurde der Haifischzahnkamm mit den Spitzen in das Gel gedrückt, so dass Taschen zum Befüllen entstanden. Jeweils 5 µl der Proben wurden mit 1 µl 6-fach konzentriertem Ladepuffer versetzt. Jeweils 5 µl des verdauten mit dem Puffer gemischten Produkts wurden in die Taschen pipettiert, wobei 2 Taschen für den Längenstandard vorbehalten blieben. Die Elektrophorese wurde bei 65 Watt für ca. 90 min durchgeführt.

Danach wurde das Gel aus der Kammer entnommen, die obere Glasscheibe vorsichtig entfernt und das Gel auf der anderen Glasplatte in einem dazu passenden Färberahmen fixiert. Die Entwicklung des Gels mittels Silberfärbung

diente der Visualisierung, bzw. Quantifizierung der DNA Fragmente und wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Schritt	Waschschritte
400 ml 10% Ethanol	3 – 5 min
400 ml 1% Salpetersäure	1 min
400 ml 2% Silbernitratlösung (400 ml aqua bidest + 1,2 g Silbernitrat)	20 min (lichtgeschützt)
400 ml aqua bidest	3 x
Entwicklerlösung aus: 1000 ml Aqua bidest, 30 g Natriumbikarbonat und 700 µl Formaldehyd	2-5 min
400 ml Aqua bidest	1 min
10 % Essigsäure	2 – 10 min
400 ml Aqua bidest	1 min

Whatman-Papier wurde auf das gefärbte Gel gelegt, angedrückt und damit das Gel von der Platte abgezogen. Es wurde auf einem Gelrockner bei 85 °C und Vakuum 120 min getrocknet. Das Verhältnis von mutierten zu nicht mutierten Produkten wurde anhand der Bandenintensität der 129 und 104 bp langen DNA-Fragmente abgeschätzt.

9. Immunhistochemische Färbung Ngfr- exprimierender Schwann-Zellen

Die bei -80°C gelagerten Gefrierschnitte wurden zunächst 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und nach folgendem Protokoll gefärbt. Alle Inkubationen sowie die Entwicklung erfolgten in einer dunklen feuchten Kammer. Als Negativkontrolle wurden die Schnitte nur mit Antikörper-Verdünner ohne einen Primärantikörper inkubiert. Der Kontrollantikörper war gegen das Protein Laminin gerichtet, das in der Basalmembran der Schwann-Zellen vorkommt. Zum Schluss erfolgte das Gegenfärben der Gewebeschnitte mit Mayers-Hemalaun-Lösung.

Schritt	Reagenz	Reaktionsbedingungen
Fixierung	Aceton	10 min bei Raumtemperatur
Trocknen		5 min bei Raumtemperatur
Eingrenzen des Gewebes	Fettstift DAKO-Pen	
Blockieren von unspezifischen Bindungen	Proteinblock	5 min
Inkubation mit Primär-Antikörper	Anti-Ngfr-, Laminin-Antikörper	1 Stunde bei Raumtemperatur in feuchter Kammer
Spülen	PBS	3 x 5 min
Inkubation mit biotinyliertem Sekundär-Antikörper	Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper	40 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer
Spülen	PBS	3 x 5 min
Inkubation	AB-Komplex	15 min Raumtemperatur in feuchter Kammer
Spülen	PBS	3 x 5 min
Entwicklung	DAB-Reagenz	5-10 sek
Waschung	Leitungswasser	5 min
Gegenfärbung	Hämatoxilin	10 sek
Bläuen und Spülen	Fließendes Leitungswasser	5 min
Entwässerung	Aufsteigende Alkoholreihe: 1: Spülen in 70% Alkohol 2: Spülen in 96% Alkohol 3: Spülen in 100% Alkohol 4: Spülen in Xylol	je 2 x 2 min

Die Antikörper wurden in Antikörper-Verdünnungsreagenz 1:500 verdünnt und in einer Menge von 100-200 µl auf die Gefrierschnitte aufgetragen. Der Ab-Komplex wurde in einer Verdünnung von 1:100 angesetzt und bei 4°C gelagert. Die Positivkontrolle mit anti-Laminin wurde ebenfalls in Antikörper-Verdünnungsreagenz 1:100 verdünnt. Das DAB-Reagenz wurde nach Angaben des Herstellers in einer Verdünnung 1:20 angesetzt (1000 µl Substrat Puffer + 50 µl DAB Chromogen-Konzentrat) und in einer Menge von 100-200 µl auf die Gefrierschnitte aufgetragen.

10. Gewebebegewinnung an Mikrodisektionsanlage

Die frisch geschnittenen oder bei -80°C gelagerten und aufgetauten Gewebeschnitte wurden zunächst mit einem anti-Ngfr- Antikörper gefärbt. Die Gegenfärbung wurde mit Hämalun durchgeführt. Nach Mikroskopieren wurden die entsprechenden Objektträger auf der Objektträgerplatte der Laser-Mikrodisektionsanlage positioniert, der gewählte Gewebebereich auf dem Computermonitor umrandet, fotografiert, mit dem Laser ausgeschnitten und in den Deckel des PCR-Gefäßes hineinkatapultiert (Abb. 2 B). Die Deckel der PCR- Gefäße wurden mit ca. 5 µl Mineralöl beschichtet, um die Adhäsion der Zellen zu verbessern.

Von den üblichen nicht beschichteten Glasobjektträgern wurden die Zellen samt Glasoberfläche in die Deckel der PCR Gefäße hineinkatapultiert (Schema 1). Bei den beschichteten Objektträgern diente als Trennmedium eine dünne Membran auf der Oberfläche des Objektträgers (Schema 2).

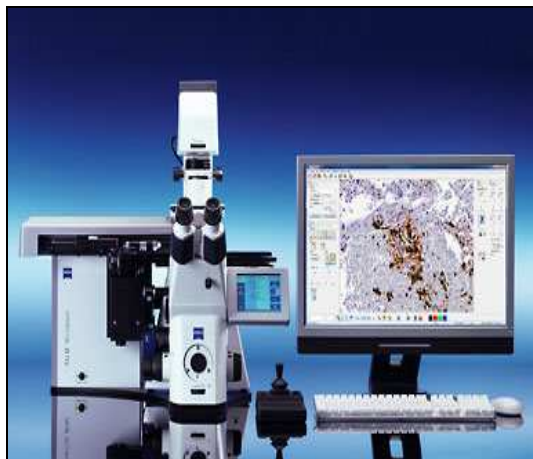
Wenn alle Deckel der PCR-Gefäße mit Gewebeproben befüllt worden waren, wurden die PCR-Gefäße mit 5 µl 50 mM NaOH gefüllt, verschlossen und anschließend zentrifugiert. Die zentrifugierten Gewebeproben wurden mit einem Tropfen Mineralöl bedeckt und bei 90°C 20 min inkubiert. Danach wurde zu jeder Probe 23 µl PCR-Mix gemischt und der Ansatz unter oben genannten Bedingungen im Thermocycler amplifiziert.

Schema 1 für die Gewebe-Mikrodissektion von den Glasobjektträgern

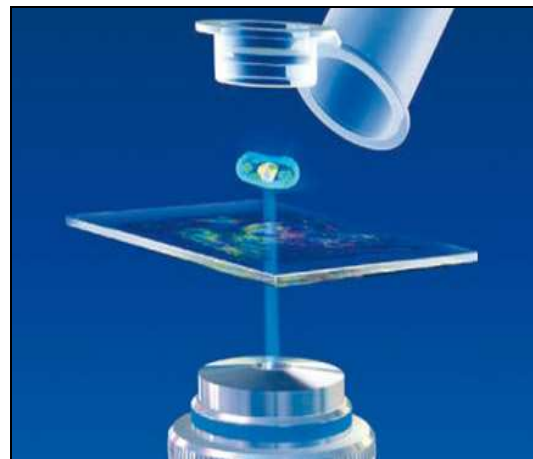
Schritt	Funktion an Laser-Mikrodissektionsanlage
Einzeichnen der gewünschten Gewebeprobe	„Cut“
Fotografieren	Foto-Knopf
Platzieren mehrerer Katapultierpunkte auf die Probe	„Auto- LPC“
Katapultieren der Gewebeprobe in den Deckel des PCR- Gefäßes	„Laser“

Schema 2 für die Gewebe-Mikrodissektion von den membranbeschichteten Objektträgern

Schritt	Funktion an Laser-Mikrodissektionsanlage
Fotografieren der gewünschten Gewebeprobe	Foto-Knopf
Herausschneiden der gewünschten Gewebeprobe (dabei wird ein schmaler Gewebestreifen für das Katapultieren übrig gelassen)	„Cut“
Setzen eines Katapultiersignals auf den Gewebesteg	„Auto- LPC“



A)



B)

Abb. 2 Laser-Mikrodissektionsanlage PALM MicroBeam von Zeiss (A) und die Darstellung des Katapultvorgangs der mikrodissezierten Gewebeprobe in einen Deckel des PCR-Gefäßes (B) aus www.zeiss.de

III. ERGEBNISSE

1. Histomorphologische Untersuchung der *N. trigemini* thymektomierter mit ENU-behandelter BDIV Ratten

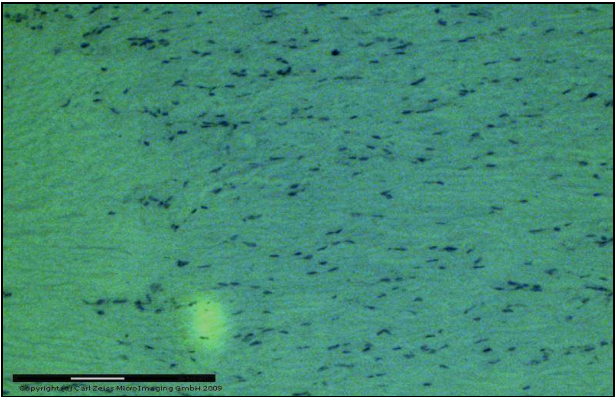
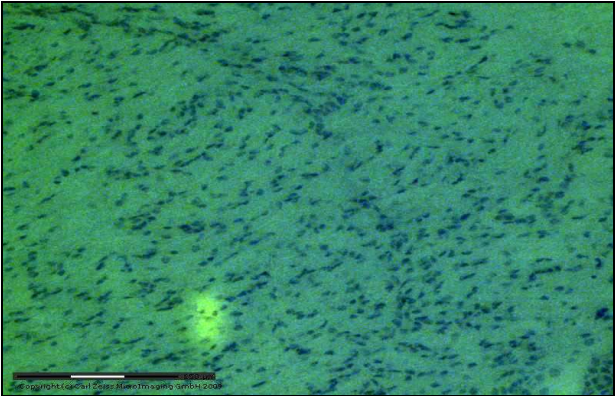
Die *N. trigemini* thymektomierter ENU-behandelter BDIV Ratten sollten auf die Anwesenheit prämaligner Schwann-Zellen bzw. MPNST anhand morphologischer Charakteristika untersucht werden. Die Gewebeschnitte wurden mit Hämatoxylin angefärbt und mikroskopisch untersucht.

Insgesamt wurden 62 *N. trigemini* thymektomierter BDIV Ratten unterschiedlichen Alters untersucht und die ENU-induzierten Veränderungen im Gewebeverband der *N. trigemini* den entsprechenden Malignitätsgraden zugeordnet (Abb. 3, Tab. 2). Diese Nerven standen zur Verfügung, da die Tiere, die keine MPNST ausgebildet hatten (ca. 80%) in den meisten Fällen andere durch ENU induzierte Tumoren des Nervensystems wie Hirn- und Rückenmarkstumoren entwickelt hatten und deswegen euthanasiert werden mussten.

Beim histologischen Grad 1 handelte es sich um Gewebe ohne bzw. mit nicht eindeutig morphologisch veränderten Schwann-Zellen. Bei den *N. trigemini*, die in Grad 2 eingruppiert wurden, fanden sich morphologisch deutlich veränderte Schwann-Zellen, die einen abgerundeten oder unregelmäßig geformten Zellkern mit einem schmalen Zytoplasmasaum aufwiesen, sowie in haufenförmigen oder straßenähnlichen Formationen vorlagen. Beim Grad 3 handelte es sich um Tumorstadien. Der histologische Grad 4 entsprach einem malignen Nervenscheidentumor (MPNST) (Abb. 3).

Bei 31 von 62 *N. trigemini* wurden kaum morphologisch veränderte Schwann-Zellen gefunden: entsprechend dem Grad 1 (Abb. 3 A). Bei 15 weiteren *N. trigemini* wurde eine unregelmäßige Gewebearchitektur mit deutlich morphologisch veränderten Schwann-Zellen gefunden, diese wurden dem Malignitätsgrad 2 zugeordnet (Abb. 3 B). Sieben *N. trigemini* enthielten Tumorstadien entsprechend dem Grad 3 (Abb. 3 C) und bei 8 *N. trigemini* war die physiologische Gewebearchitektur komplett zerstört zugunsten einer Ansammlung kleiner runder Zellen mit pleomorphen Kernen. Diese wurden als maligne Nervenscheidentumoren (MPNST) identifiziert und dem Grad 4 zugeordnet (Abb. 3 D).

Interessant war die Altersverteilung der Tiere mit *N. trigemini*, die den entsprechenden Malignitätsgraden zugeordnet waren. *N. trigemini*, die von ENU behandelten thymektomierten Ratten stammten, die weniger als 200 Tage alt wurden, entsprachen durchschnittlich dem Grad 2,3. Bei Nerven von Tieren, die 200-300 Tage alt wurden, lag der durchschnittliche Malignitätsgrad bei 1,9, bei zwischen 300-400 Tagen entnommenen Nerven bei 1,5 und bei Nerven von Tieren, die älter als 400 Tage geworden waren bei 1,8 (Tab.1).

Histomorphologischer Grad	Beispielbilder der <i>N. trigemini</i> thymektomierter BDIV Ratten (Hämatoxylin-Färbung)
<p>A: Grad 1: 31 <i>N. trigemini</i> ohne morphologisch veränderte Schwann-Zellen (Originalvergrößerung 100 x)</p>	 <p>This micrograph shows a section of a trigeminal nerve from a rat with Grade 1 neurofibrosarcoma. The tissue is stained with hematoxylin and eosin (H&E). The Schwann cells appear normal, with no significant morphological changes. A scale bar is visible in the bottom left corner.</p>
<p>B: Grad 2: 15 <i>N. trigemini</i> mit deutlich morphologisch veränderten Schwann-Zellen (Originalvergrößerung 100 x)</p>	 <p>This micrograph shows a section of a trigeminal nerve from a rat with Grade 2 neurofibrosarcoma. The Schwann cells exhibit clear morphological changes, such as increased nuclear size and hyperchromasia. A scale bar is visible in the bottom left corner.</p>

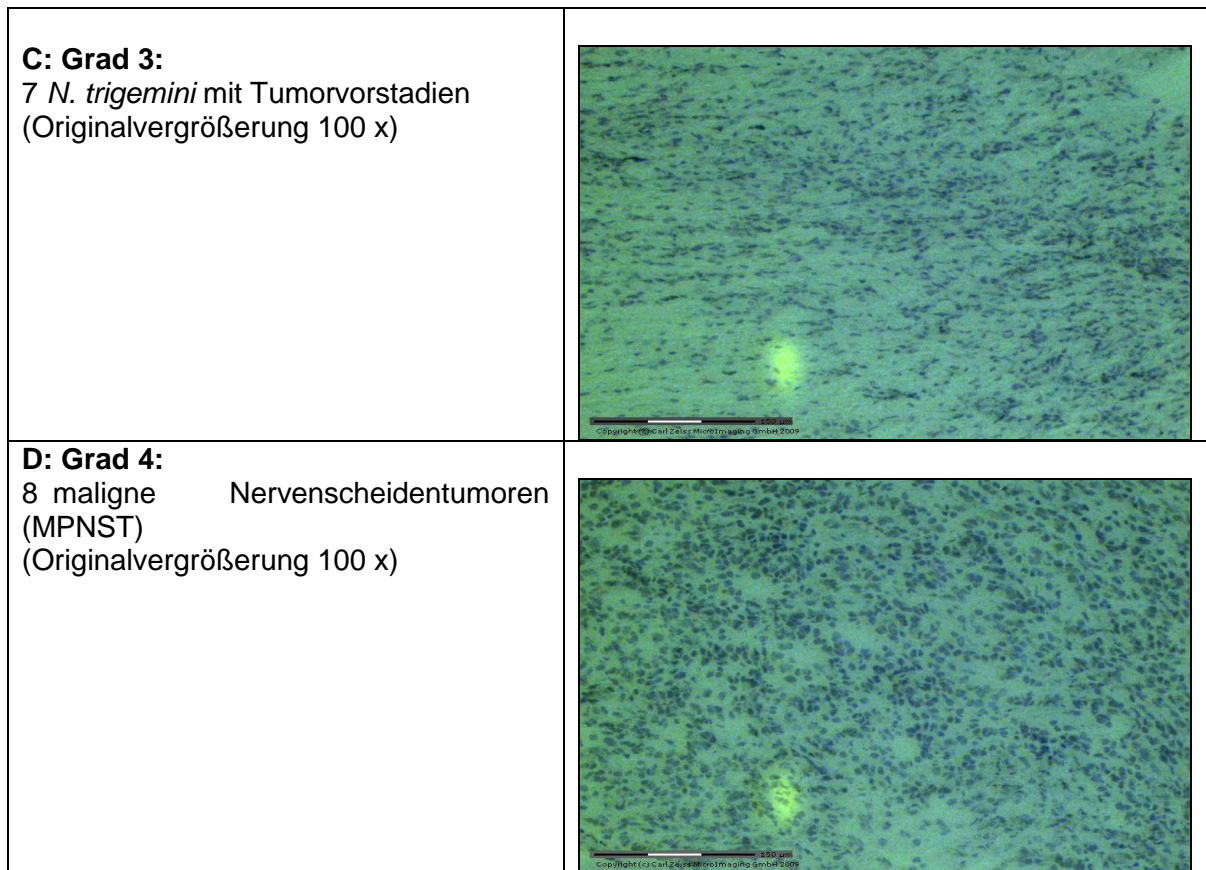


Abb. 3 Nach histologischen Graden sortierte *N. trigemini* thymektomierter BDIV Ratten (Hämatoxylin-Färbung)

Tab. 1 Histologisches Grading der *N. trigemini* thymektomierter BDIV Ratten in Bezug gesetzt zur Lebensspanne

Lebensalter der Tiere	durchschnittlicher Malignitätsgrad
< 200 Tage	2,3
200 – 300 Tage	1,9
300 – 400 Tage	1,5
> 400 Tage	1,8

2. Manuelle Mikrodisektion der Hirn-Nerven-Grenze zur Detektion *Neu/ErbB2*-mutierter Schwann-Zellen in den *N. trigemini* thymektomierter mit ENU-behandelter BDIV Ratten

Nach den bisherigen Untersuchungen ist die *Neu/ErbB2* Gen Mutation in prämaligen und malignen Schwann-Zellen in den *N. trigemini* ENU-behandelter tumorsusceptibler BDIX Ratten fast immer vorhanden, während sie in den *N. trigemini* tumorresistenter BDIV Ratten nur etwa bis zum Tag 100 nachweisbar ist. Bevorzugt findet man diese Zellen im Bereich der Hirn-Nerven-Grenze (Kindler-Rohrborn et al., 2000; Rajewsky et al., 1977).

In Hämatoxylin gefärbten Gewebeschnitten der zur Verfügung stehenden *N. trigemini* thymektomierter BDIV Ratten (N=62) wurde dieser Gewebebereich mittels einer sterilen Kanüle mikrodiseziert (Abb. 4 A und C) und die DNA im Hinblick auf die *Neu/ErbB2* Mutation analysiert (Tab. 2). Bei MPNST wurde ein willkürlich ausgewähltes Gewebeareal mikrodiseziert (Abb. 4 B und D). Sofern mutierte Allele des *Neu/ErbB2* Gens anwesend waren, zeigte sich nach dem Restriktionsverdau und der elektrophoretischen Trennung der PCR Produkte zusätzlich zur 129 bp langen Wildtypbande eine kürzere, 104 bp lange Bande, die dem mutierten Allel entspricht (Abb. 4). Die Relation zwischen den Wildtyp- und den mutierten Allelen wurde anhand der Intensität der entsprechenden Banden geschätzt (Abb. 4).

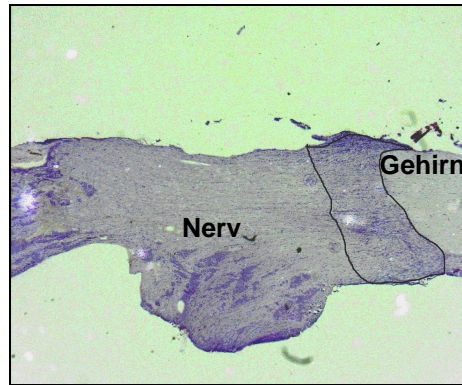
Bei nur einem von 28 *N. trigemini* (Malignitätsgrad 1) wurden *Neu/ErbB2*-mutante Allele gefunden (Tab. 2 und 3). Von 15 *N. trigemini*, die dem Malignitätsgrad 2 zugehörten, wiesen 5 Nerven mutierte Allele auf (Tab. 2 und 3). Da es nicht bei allen Nerven gelang die DNA zu isolieren, entspricht die Anzahl der untersuchten Nerven denjenigen, bei denen die PCR erfolgreich durchgeführt werden konnte (Tab.3).

Interessanterweise wurden *N. trigemini* mit Tumorzellvorstufen und MPNST gefunden, die histologisch alle Malignitätszeichen erfüllten bei denen jedoch die mutierten Allele nicht oder nur in geringem Maße nachzuweisen waren. Das betraf 4 von 8 MPNST und 1 von 5 *N. trigemini*, der als Tumorstadium identifiziert worden waren (Tab. 2 und 3). Es konnte andererseits gezeigt werden, dass in den *N. trigemini*, in denen mutierte Allele des *Neu/ErbB2* Gens nachgewiesen wurden, der Prozentsatz mutierter Allele mit dem Malignitätsgrad des Gewebes stieg.

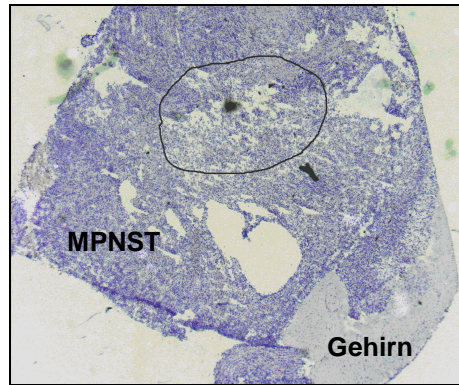
thymektomierte BDIV Ratten

N. trigemini mit Tumorvorstufen

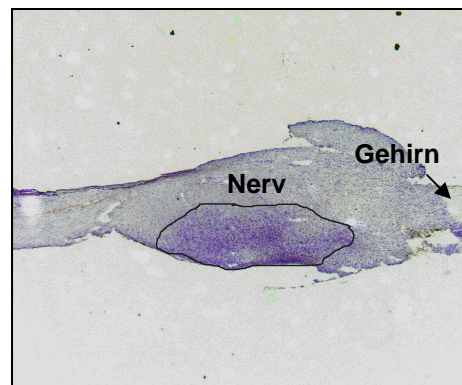
MPNST



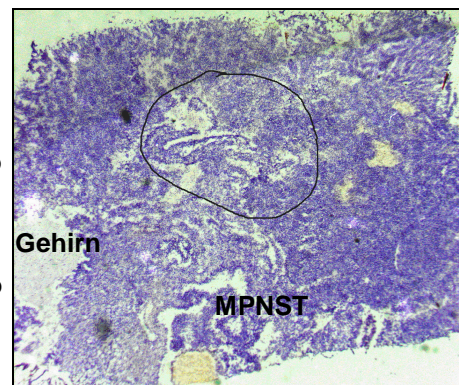
A)



B)



C)



D)

Abb. 4 Manuell mikrodissizierte Geweberegionen (schwarz umrandet) aus den mit Hämatoxylin gefärbten *N. trigemini* mit Tumorvorstufen (A und C) und MPNST (B und D) thymektomierter BDIV Ratten und dazugehörige Spuren des silbergefärbten Acrylamidgels nach der elektrophoretischen Auftrennung der mit *MnII* verdauten PCR Produkte des *Neu/ErbB2* Gens

Tab. 2 Anwesenheit der *Neu/ErbB2* Mutation in *N. trigemini* thymektomierter BDIV Ratten sortiert nach Alter

Alter in Tagen	Histol. Grading	<i>Neu/ErbB2</i> Mutation	<i>N. trigemini</i> Seite: rechts oder links und Tiernummer
56	2		57 links
56	2	30%	57 rechts
109	2		41 links
109	1		41 rechts
146	1	keine PCR	21 links
146	1		21 rechts
146	4 = MPNST		E rechts
146	4 = MPNST		E links
165	3	50%	16 links
165	3	50%	16 rechts
174	4 = MPNST	80%	13 rechts
191	1		4 rechts
204	4 = MPNST	80%	46 links
204	4 = MPNST	80%	46 rechts
219	3	30%	50 links
219	3		50 rechts
223	1		5 links
223	2	40%	5 rechts
246	1		52 links
246	1	30%	52 rechts
251	2	20%	62 links
251	2		62 rechts
257	1		11 links
257	2		12 links
257	1		12 rechts
261	1		42 links
261	4 = MPNST		42 rechts
264	1	keine PCR	D
272	1		59 rechts
280	2	20%	58 links
280	1		85 a
280	1		85 b
288	1		55 rechts
292	1		17 rechts
293	4 = MPNST	50%	1 rechts
293	1	keine PCR	2 links
293	2		2 rechts
313	1		67 links
313	1		67 rechts
319	1		36 links
319	1		36 rechts
321	1		40 links

321	1		40 rechts
327	2		34 rechts
332	1		3 links
332	2		3 rechts
332	2		14 links
332	2		14 rechts
337	2	40%	45 rechts
348	3	40%	44 links
348	1		44 rechts
354	1		6 links
354	2		6 rechts
362	1		49 links
362	1		49 rechts
387	4 = MPNST		82 links
419	1		18 links
469	3	keine PCR	65 links
469	1		65 rechts
553	1		53 rechts
582	3	30%	64 a
582	3	keine PCR	64 b

Tab. 3 Analyse der manuell mikrodisssezierten Hirn-Nerven-Grenzen der *N. trigemini* thymektomierter BDIV Ratten im Hinblick auf den Prozentsatz der mutierten *Neu/Erbb2* Gen Allele

Malignitätsgrad der Probe	im <i>Neu/Erbb2</i> Gen mutiert	
	Anzahl	Durchschnitt des geschätzten Prozentsatzes mutierter Allele des <i>Neu/Erbb2</i> Gens
1	1/28 (3,5 %) (28 von 31 erfolgr. PCR)	30 %
2	5/15 (33%)	30 %
3	4/5 (80%) (5 von 7 erfolgr. PCR)	40 %
4	4/8 (50 %)	50 %

3. Lasergestützte Mikrodissektion prämaligner Schwann-Zellen nach morphologischen Kriterien in den *N. trigemini* thymektomierter und euthymischer ENU-behandelter BDIV Ratten zur Detektion der *Neu/ErbB2* Mutation

Um kleinere Zellverbände gezielt untersuchen zu können, wurden Ansammlungen von Schwann-Zellen, die nach morphologischen Kriterien als prämaligne angesehen wurden, aus den mit Hämatoxylin gefärbten *N. trigemini* ENU-behandelter thymektomierter und euthymischer BDIV Ratten mit Hilfe einer Mikrodissektionsanlage lasergestützt isoliert. Dieses Material wurde anschließend im Hinblick auf die *Neu/ErbB2* Mutation untersucht.

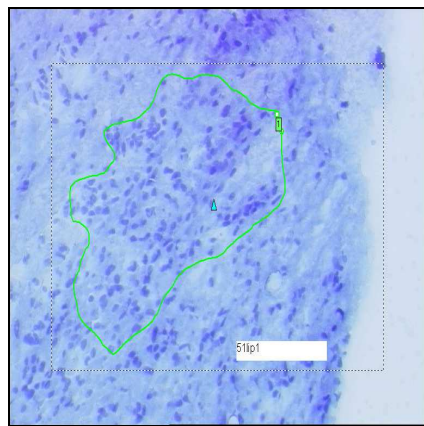
Es sollte die Frage geklärt werden, ob bei diesen Schwann-Zellen eine Korrelation zwischen der Zellmorphologie und dem Vorhandensein der *Neu/ErbB2* Mutation zu finden ist.

Bei den euthymischen BDIV Ratten wurde das Alter der Tiere zwischen 60 und 100 Tagen gewählt, da in dieser Zeitspanne bei der resistenten BDIV Ratte *Neu/ErbB2*-mutante Schwannzellverbände vorhanden sind, die ca. ab Tag 90 eliminiert werden (Kindler-Rohrborn et al., 2000).

Pro *N. trigeminus* wurden etwa 10 Gewebeareale mit ca. 50-200 prämaligen Schwann-Zellen ausgesucht und mikrodisseziert (Abb. 5). Das Verhältnis zwischen mutierten und Wildtyp-Allelen des *Neu/ErbB2* Gens wurde wieder anhand der Intensität der 104 bp und der 129 bp langen Fragmente im Acrylamidgel geschätzt (Abb. 5).

Bei den 5 *N. trigemini* thymektomierter BDIV Ratten wurden 44 als prämaligne eingestufte Gewebeareale für die Analyse gewonnen, wovon 29/44 (66%) die *Neu/ErbB2* Mutation aufwiesen (Tab. 4 A und C). Im Durchschnitt lag der Anteil der *Neu/ErbB2*-mutierten Allele in diesen Arealen bei 35%. Bei den 9 euthymischen BDIV Ratten im Alter zwischen 60–100 Tagen wurden 73 Gewebeareale für die Analysen gewonnen, wovon 29/73 (40%) *Neu/ErbB2* Mutation aufwiesen (Tab. 4 B und D). Der prozentuale Durchschnitt der mutierten Allele lag bei diesen Arealen bei 25 % (Tab. 4).

BDIV thymektomiert



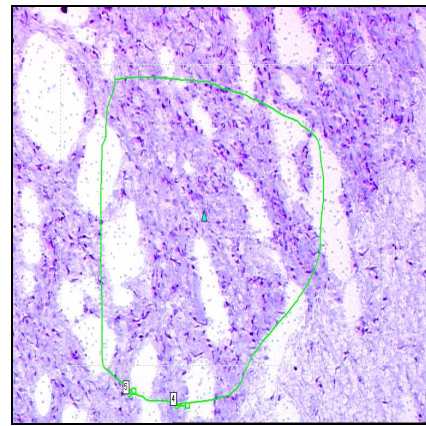
A)



129 bp

104 bp

BDIV euthymisch

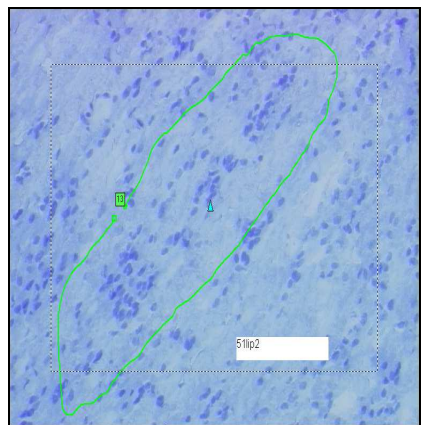


B)



129 bp

104 bp

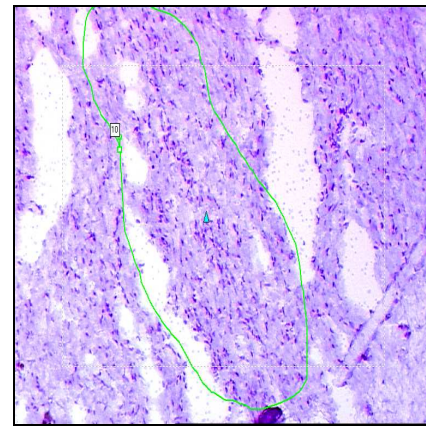


C)



129 bp

104 bp



D)



129 bp

104 bp

Abb. 5 Für die Mikrodissektion gewählte prä maligne Schwann-Zellen (grün umrandet) im Hämatoxylin gefärbten *N. trigeminus* einer 219 Tage alten thymektomierten BDIV Ratte (A und C) und einer 100 Tage alten euthymischen BDIV Ratte (B und D) und die dazugehörige Spuren des silbergefärbten Acrylamidgels nach der elektrophoretischen Auftrennung der mit *MnII* verdauten PCR Produkte des *Neu/ErbB2* Gens

Tab. 4 Nachweis der *Neu/ErbB2* Mutation in lasergestützt mikrodisssezierten prämaligen Schwann-Zellen aus *N. trigemini* thymektomierter und euthymischer BDIV Ratten

Gewebeareale mit prämaligen Schwann-Zellen	mutierte Allele des <i>Neu/ErbB2</i> Gens nachgewiesen bei	Durchschnitt des geschätzten Prozentsatzes mutierter Allele des <i>Neu/ErbB2</i> Gens
44 Areale aus den <i>N. trigemini</i> thymektomierter BDIV Ratten	29/44 (66 %)	35 %
73 Areale aus den <i>N. trigemini</i> euthymischer BDIV Ratten (Alter 60 - 100 Tage)	29/73 (40 %)	25 %

4. Lasergestützte Mikrodisssektion Ngfr-exprimierender Schwann-Zellen in den *N. trigemini* thymektomierter sowie euthymischer BDIV Ratten zur Untersuchung des Mutationsstatus des *Neu/ErbB2* Gens

Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass der niedrig affine Nervenwachstumsfaktorrezeptor (Ngfr) ein potientes Markermolekül für (prä)maligne Schwann-Zellen darstellt (Levin und Kindler-Röhrborn, unveröffentliche Ergebnisse). Da die Ngfr Expression ein zusätzliches, leichter zu objektivierendes, über die reine Morphologie hinausgehendes Kriterium für Tumorstufen darzustellen scheint, sollte anhand von *N. trigemini* thymektomierter und euthymischer ENU behandelte BDIV Tiere die Frage geklärt werden, inwieweit die dort vorhandenen prämaligen Schwann-Zellen Ngfr exprimieren und ob es eine Korrelation zwischen der Expressionsstärke und der Anwesenheit der *Neu/ErbB2* Mutation gibt.

Die Gewebeschnitte von sechs *N. trigemini* thymektomierter BDIV Ratten und von drei *N. trigemini* euthymischer BDIV Ratten wurden mit einem Antikörper gegen Ngfr immunhistochemisch gefärbt. Die Färbintensität der prämaligen Zellverbände in den Gewebeschnitten wurde einer relativen Expressionsskala zugeordnet (Ngfr-schwach, -mäßig und -stark exprimierend). Sie wurden aus den Gewebeschnitten lasergestützt mikrodissseziert und auf das Vorhandensein der *Neu/ErbB2* Mutation untersucht.

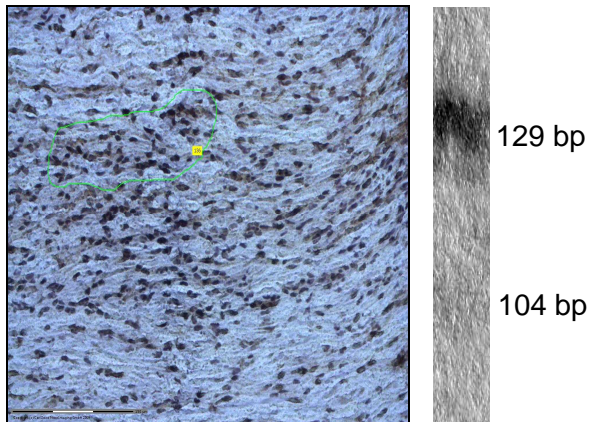
Aus Gewebeschnitten der 6 *N. trigemini* ENU behandelter thymektomierter BDIV Ratten wurden 66 Zellverbände für die Analysen gewählt: 15 Ngfr schwach, 22 Ngfr mäßig exprimierende und 11 Ngfr stark exprimierende Zellverbände (Abb. 6). Dazu kamen 18 Zellverbände, die morphologisch auffällig waren, jedoch nicht Ngfr exprimierten. Das Alter der untersuchten 6 Tiere betrug: 56, 239, 327, 381 und 433 Tage.

Von den 15 Ngfr schwach exprimierenden Zellverbänden thymektomierter BDIV Ratten wiesen 6/15 (40 %) die *Neu/ErbB2* Mutation auf, in 11/22 (50 %) der Ngfr mäßig exprimierenden Gewebeschnitten und in 4/11 (36%) Ngfr stark exprimierenden Zellverbänden wurden die *Neu/ErbB2*-mutanten Allele gefunden. Von den 18 Zellverbänden ohne Ngfr-Expression wiesen 7/18 (39 %) die *Neu/ErbB2* Mutation auf (Tab. 5). In den Ngfr schwach exprimierenden Zellverbänden thymektomierter BDIV Ratten lag der durchschnittliche Prozentsatz der mutierten Allele bei 10 %, in den Ngfr mäßig exprimierenden Zellverbänden bei 10% und in den Ngfr stark exprimierenden bei < 5%. Der durchschnittliche Prozentsatz der mutierten Allele bei den Zellverbänden ohne Ngfr-Expression lag bei ca. 10% (Tab. 5).

Bei den 47 Gewebeschnitten der 3 *N. trigemini* euthymischer ENU behandelte BDIV Ratten ergab sich folgende Verteilung: von 16 Ngfr schwach exprimierenden Zellverbänden wiesen 11/16 (ca. 70%) mutierte Allele auf und von 9 Ngfr mäßig exprimierenden Zellverbänden wiesen 7/9 (ca. 80%) mutierte Allele auf (Abb. 7; Tab. 5). Von 2 Ngfr stark exprimierenden Zellverbänden wiesen 2/2 (100%) mutierte Allele auf und von 20 Zellverbänden ohne Ngfr-Expression beinhalteten 10/20 (50%) die *Neu/ErbB2* Mutation (Abb. 7). Das Alter der 3 euthymischen BDIV Tiere betrug: 60, 69 und 240 Tage. Der durchschnittliche Prozentsatz der mutierten Allele bei *N. trigemini* euthymischer BDIV Ratten lag bei den Ngfr schwach exprimierenden Zellverbänden bei 10 %, bei den Ngfr mäßig exprimierenden Zellverbänden bei 20 % und bei Ngfr stark exprimierenden Zellverbänden bei 50%. Bei den Zellverbänden ohne Ngfr – Expression lag der Durchschnittsprozentsatz der mutierten Allele bei 10% (Tab. 5)

BDIV Ratten thymektomiert

Ngfr stark exprimierende Zellen



Ngfr schwach exprimierende Zellen

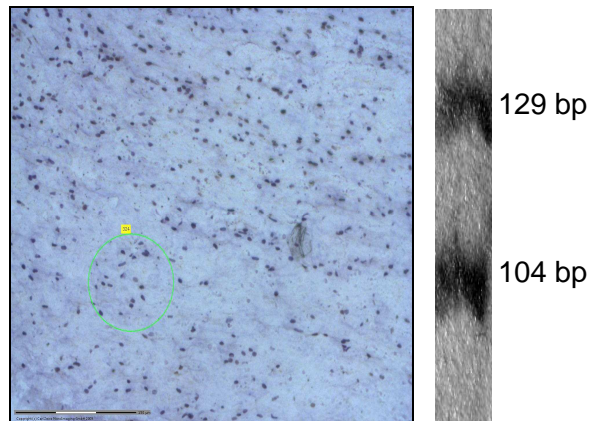
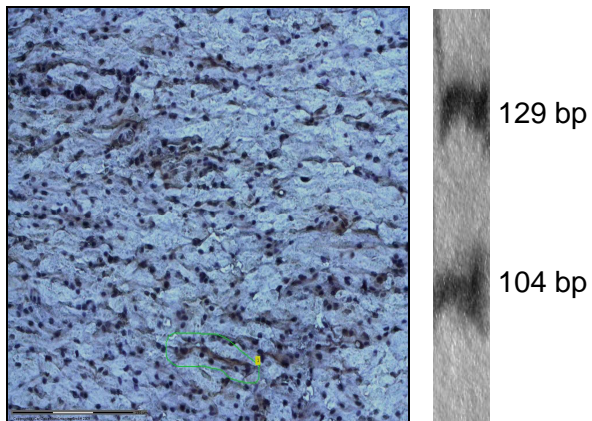
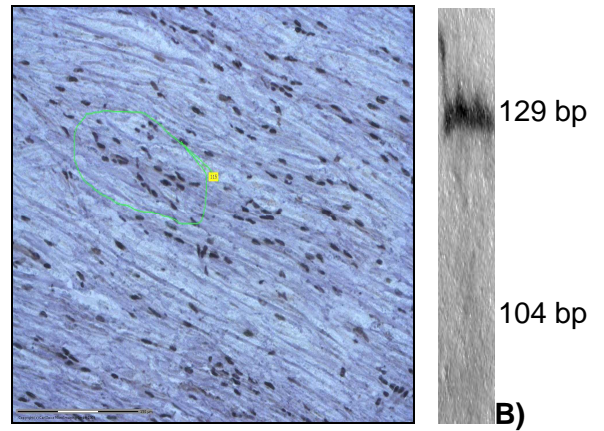
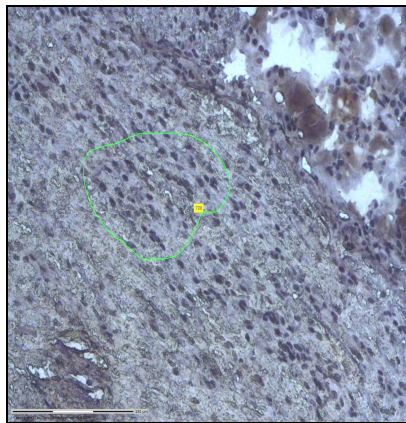


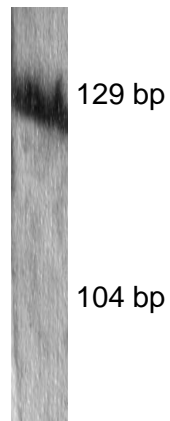
Abb. 6 Mikrodissizierte mit anti Ngfr-Antikörpern immunhistochemisch gefärbte Schwann-Zellen aus den *N. trigemini* der ENU-behandelten thymektomierten BDIV Ratten und die dazugehörige Spuren des silbergefärbten Acrylamidgels nach der elektrophoretischen Auftrennung der mit *MnII* verdauten PCR Produkte des *Neu/ErbB2* Gens

BDIV Ratten euthymisch

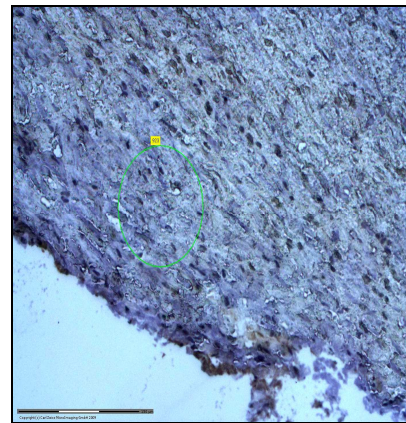
Ngfr stark exprimierende Zellen



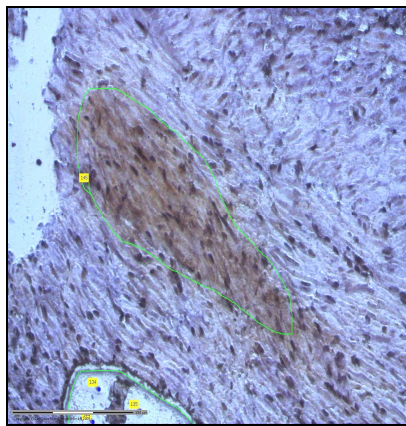
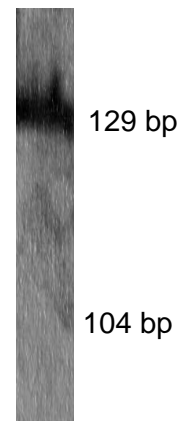
A)



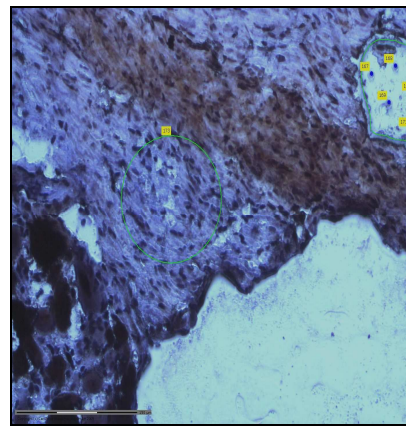
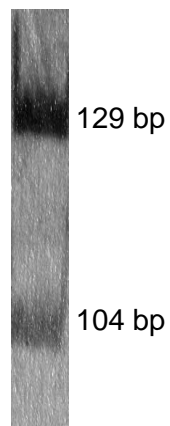
Ngfr schwach exprimierende Zellen



B)



C)



D)

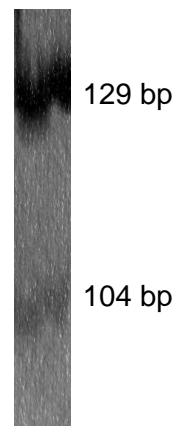


Abb. 7 Mikrodissizierte mit anti Ngfr-Antikörpern immunhistochemisch gefärbte Schwann-Zellen aus den *N. trigemini* einer 69 Tage (A und B) und 60 Tage (C und D) alten ENU-behandelten euthymischen BDIV Ratte und die dazugehörige Spuren des silbergefärbten Acrylamidgels nach der elektrophoretischen Auftrennung der mit *MnII* verdauten PCR Produkte des *Neu/ErbB2* Gens

Tab. 5 Analyse der Ngfr exprimierenden Schwann-Zellen thymektomierter und euthymischer ENU-behandelter BDIV Ratten auf die Anwesenheit der *Neu/Erbb2* Mutation

Anzahl der Zellverbände der <i>N. trigemini</i>	mutierte Allele des <i>Neu/Erbb2</i> Gens vorhanden	Durchschnittsprozentsatz der mutierten Allele des <i>Neu/Erbb2</i> Gens (geschätzt nach Bandenintensität)
BDIV, thymektomiert		
15 Ngfr schwach exprimierende	6/15 (ca. 40%)	10 %
22 Ngfr mäßig exprimierende	11/22 (ca. 60%)	10%
11 Ngfr stark exprimierende	4/11 (ca.35 %)	< 5%
18 ohne Ngfr Expression	7/18 (ca. 40%)	10 %
BDIV, euthymisch		
16 Ngfr schwach exprimierende	11/16 (ca. 70%)	10%
9 Ngfr mäßig exprimierende	7/9 (ca. 80%)	20%
2 Ngfr stark exprimierende	2/2 (100%)	50%
20 ohne Ngfr Expression	10/20 (50%)	10%

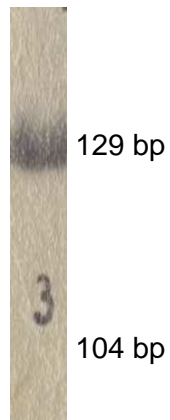
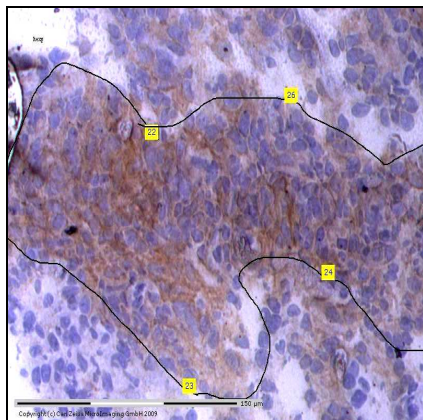
5. Lasergestützte Mikrodisektion Ngfr-exprimierender Schwann-Zellen in den MPNST thymektomierter BDIV Ratten zur Untersuchung des Mutationsstatus des *Neu/Erbb2* Gens

Für die Analysen wurden drei MPNST thymektomierter BDIV Ratten gewählt und die Gewebeschnitte mit anti-Ngfr-Antikörper immunhistochemisch gefärbt. Daraus wurden Ngfr stark- und Ngfr schwach exprimierende Zellverbände mikrodiseziert und auf das Vorhandensein der *Neu/Erbb2* Mutation analysiert (Abb. 8).

Insgesamt wurden 24 stark und 22 schwach Ngfr exprimierende Zellverbände für die Analysen gewonnen. Während von den 24 Ngfr stark exprimierenden Zellverbänden acht die *Neu/Erbb2* Mutation aufwiesen (ca. 35%), war sie bei vier der 22 Ngfr schwach exprimierenden Zellverbände (ca. 20%) nachweisbar. In den Ngfr stark exprimierenden *Neu/Erbb2*-mutanten Zellverbänden lag der durchschnittliche prozentuale Anteil der mutierten Allele bei 25%, in den Ngfr schwach exprimierenden Zellverbänden lag der Durchschnitt der mutierten Allele bei 10% (Tab. 6).

MPNST der thymektomierten BDIV Ratten

Ngfr stark exprimierende Zellen



Ngfr schwach exprimierende Zellen

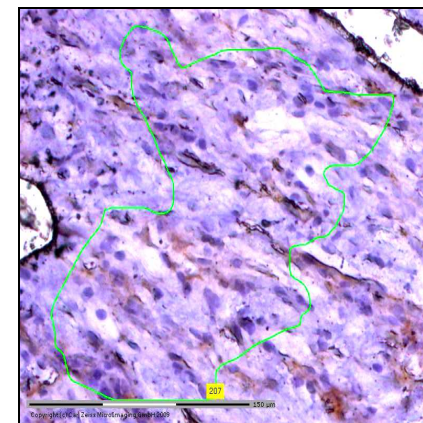
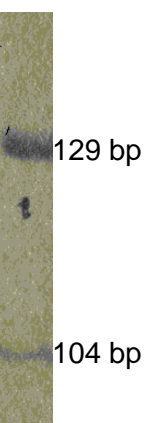
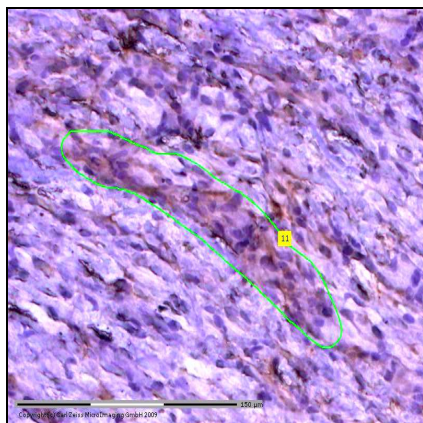
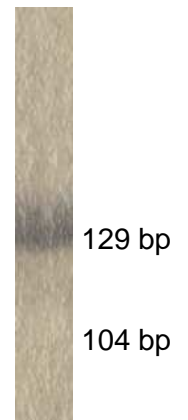
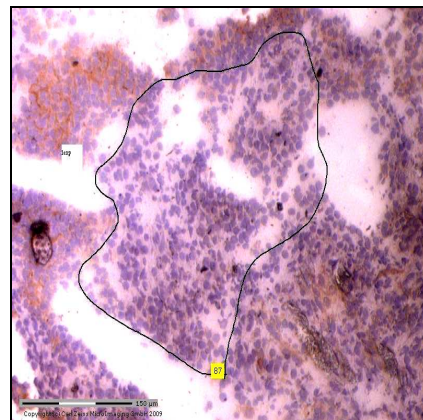


Abb. 8 Zellverbände aus zwei MPNST der thymektomierten BDIV Ratten (immunhistochemische Färbung mit anti-Ngfr-Antikörpern) und die dazugehörige Spuren des silbergefärbten Acrylamidgels nach der elektrophoretischen Auftrennung der mit *MnII* verdauten PCR Produkte des *Neu/ErbB2* Gens

Tab. 6 Analyse der *Neu/ErbB2* Mutation in Ngfr stark und schwach exprimierenden malignen Schwann-Zellen aus MPNST thymektomierter BDIV Ratten

Anzahl der Zellverbände	Davon im <i>Neu/ErbB2</i> Gen mutiert	durchschnittlicher prozentualer Anteil mutierter Allele des <i>Neu/ErbB2</i> Gens
24 Ngfr stark exprimierend	8/24 (ca. 35%)	ca. 25 %
22 Ngfr schwach exprimierend	4/22 (ca. 20%)	ca. 10 %

6. Histomorphologische Untersuchung von MPNST, in unterschiedlichen Rattenstämmen, bzw. Hybriden, unter dem Aspekt der Ngfr-Expression

Weitere Untersuchungen bezogen sich darauf, inwieweit die malignen Schwann-Zellen in MPNST, die in Kreuzungen von BDIV und BDIX Ratten, bzw. kongenen Rattenstämmen entstanden waren, Ngfr exprimieren.

Die Gewebe von Tumoren, die in (BDIV x BDIX) F₂ Kreuzungen, bzw. in (BDIV x BDIX) x BDIX Rückkreuzungs-Hybriden sowie in kongenen BDIX.BDIV-*Mss4a* Ratten entstanden waren, standen in großer Anzahl zur Verfügung. Die entsprechenden Gewebeschnitte wurden mit anti-Ngfr-Antikörper gefärbt und anschließend mikroskopisch untersucht.

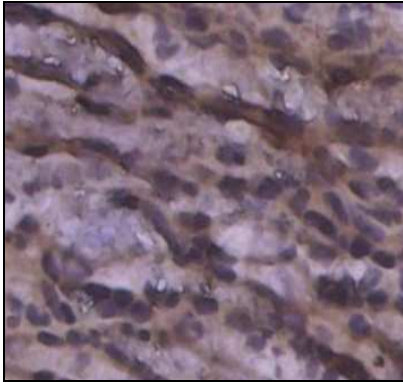
Insgesamt wurden vier MPNST der BDIV x BDIX-Generation, drei MPNST der kongenen BDIX.BDIV-*Mss4a* Tiere, acht MPNST der Rückkreuzungshybride, drei MPNST thymektomierter und ein MPNST einer euthymischen BDIV Ratte untersucht.

Bei den MPNST der F₂-Generation, der BDIX.BDIV-*Mss4a* Tiere, bei den thymektomierten BDIV Ratten sowie bei dem Tumor der BDIV Ratte gab es sowohl Ngfr stark exprimierende Schwann-Zellen als auch solche, die keine Ngfr-Expression aufwiesen (Abb. 9; Tab. 7).

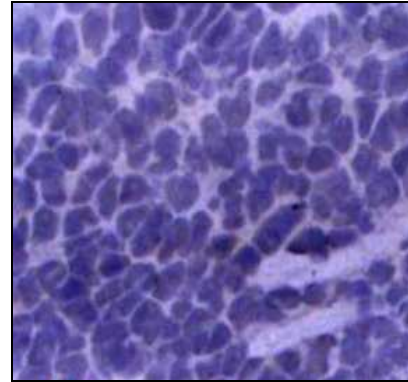
Im Gegensatz dazu wies bei MPNST der Rückkreuzungshybride und der BDIX Ratten nahezu jede maligne Schwann-Zelle eine starke Ngfr Expression auf (Abb. 10; Tab. 7).

MPNST einer BBIX.BDIV *Mss4a* Ratte

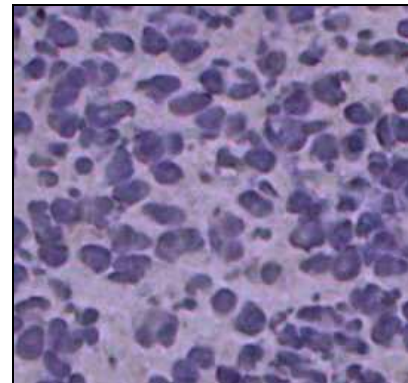
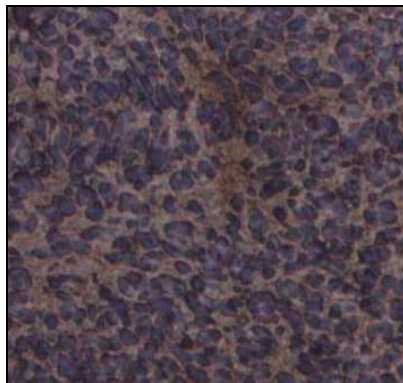
Ngfr stark exprimierende Zellen



Ngfr schwach exprimierende Zellen



MPNST einer (BDIV x BDIX)_{F2}-Ratte



MPNST einer euthymischen BDIV Ratte

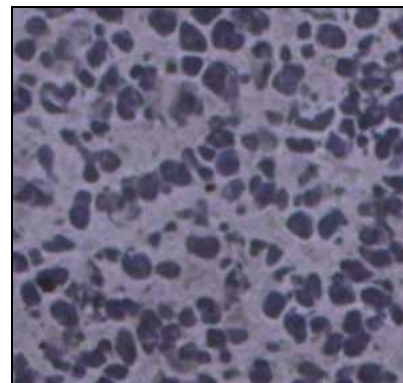
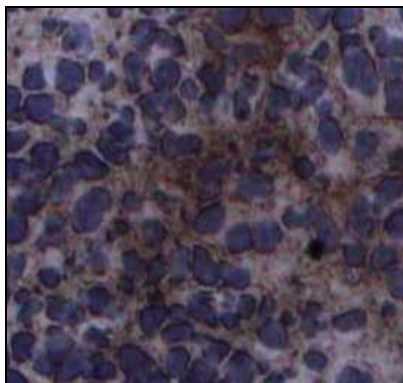


Abb. 9 Mit anti Ngfr-Antikörper immunhistochemisch gefärbten MPNST

Tab. 7 Ngfr-Expression in MPNST

Stamm bzw. Kreuzung, in denen MPNST entstanden waren	Ngfr Expression		
	Keine Ngfr-Expression	Sowohl Ngfr exprimierende als auch nicht exprimierende Zellen	Durchgehend Ngfr-exprimierende Zellen
BDIV		X	
(BDIV x BDIX)-F2		X	
BBIX.BDIV- <i>Mss4a</i>		X	
BDIV thymektomiert		X	
(BDIV x BDIX) x BDIX			x
BDIX			x

7. Mikrodissektion Ngfr stark und schwach exprimierender Schwann-Zellen in den MPNST von (BDIV x BDIX) x BDIX Ratten und Detektion von mutierten Allelen des *Neu/ErbB2* Gens

Insgesamt wurden 8 MPNST der (BDIV x BDIX) x BDIX Rückkreuzungstiere für die Untersuchung gewählt. Bei manchen dieser MPNST war es schwierig, Zellansammlungen zu finden, die nicht Ngfr exprimierten, da sie fast vollständig aus Ngfr exprimierenden Schwann-Zellen bestanden s. o. (Abb. 10).

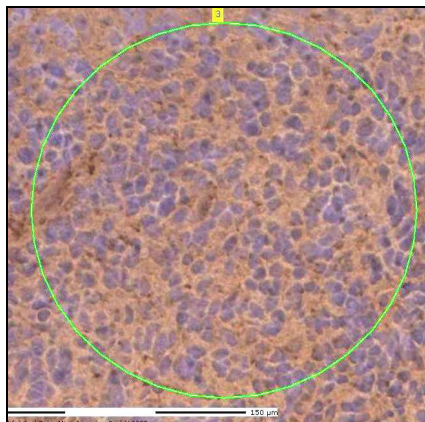
Insgesamt wurden 42 stark und 15 schwach Ngfr exprimierende Zellverbände für die Analyse gewonnen. Von 42 stark exprimierenden Zellverbänden (Abb. 10 a und c) wiesen 35/47 (ca. 80%) die *Neu/ErbB2* Mutation auf (Tab. 8).

In 9 von 15 (60%) der schwach exprimierenden Zellverbänden (Abb. 10 b und d) ließ sich die *Neu/ErbB2* Mutation nachweisen (Tab. 8).

In den Ngfr stark exprimierenden Zellverbänden, in denen die *Neu/ErbB2* Mutation nachweisbar war, lag der Prozentsatz der mutierten Allele durchschnittlich bei ca. 70%, in den Ngfr schwach exprimierenden bei ca. 50% (Tab. 8).

MPNST der (BDIV x BDIX) x BDIX Rückkreuzungsratten

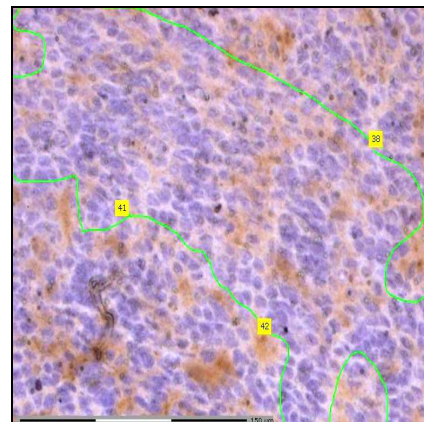
Ngfr stark exprimierende Zellen



129 bp

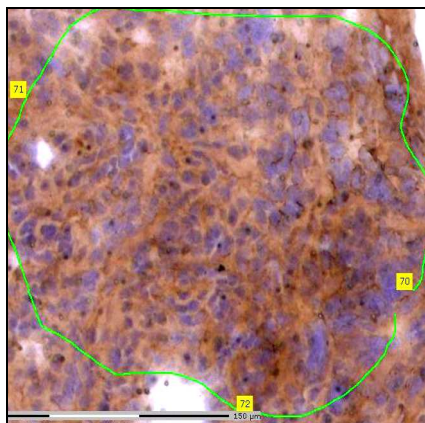
104 bp

Ngfr schwach exprimierende Zellen



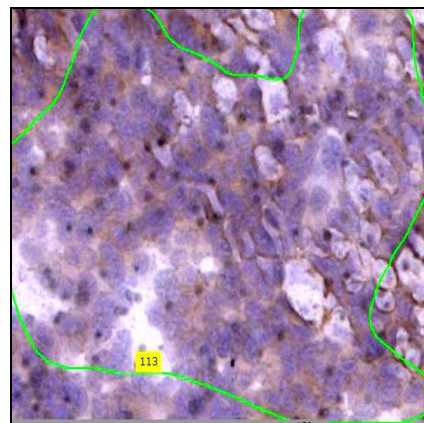
129 bp

104 bp



129 bp

104 bp



129 bp

104 bp

Abb. 10 Zellverbände aus den MPNST der (BDIV x BDIX) x BDIX Rückkreuzungsratten (immunohistochemische Färbung mit anti-Ngfr-Antikörpern) und die dazugehörige Spuren des silbergefärbten Acrylamidgels nach der elektrophoretischen Auftrennung der mit *MnII* verdauten PCR Produkte des *Neu/ErbB2* Gens

Tab. 8 Analyse der Ngfr exprimierenden Schwann-Zellen in MPNST der (BDIV x BDIX) x BDIX Rückkreuzungsratten auf die Anwesenheit der *Neu/ErbB2* Mutation

Anzahl der Zellverbände	<i>Neu/ErbB2</i> Mutation nachgewiesen bei	Durchschnittlicher prozentualer Anteil der mutierter Allele des <i>Neu/ErbB2</i> Gens
42 Ngfr stark exprimierende Zellverbände	35/42 (80%)	70%
15 Ngfr schwach exprimierende Zellverbände	9/15 (60%)	50 %

IV: DISKUSSION

1. Charakterisierung der prämaligen und malignen Schwann-Zellen anhand der Histomorphologie und der *Neu/ErbB2* Mutation

In dieser Arbeit wurden prämale und maligne Schwann-Zellen, die durch die Einwirkung des alkylierenden Karzinogens Ethylnitrosoharnstoff im peripheren Nervensystem immunkompetenter und thymektomierter BD Ratten entstanden waren, mit Hilfe histomorphologischer Kriterien und molekularer Marker (*Neu/ErbB2* Mutation, Ngfr-Expression) charakterisiert. Dadurch sollten Aufschlüsse über die molekularen und zellulären Mechanismen, die das unterschiedliche Tumorrisiko der BD Ratten determinieren, erhalten werden.

Nach Thymektomie hatten ca. 20% der im immunkompetenten Zustand tumorresistenten BDIV Ratten MPNST entwickelt. Die meisten übrigen Tiere hatten Tumoren des Gehirns und Rückenmarks ausgebildet und mussten deswegen zu unterschiedlichen Zeitpunkten euthanasiert werden. Daher standen 62 *N. trigemini* ENU-behandelter thymektomierter BDIV Tiere verschiedener Altersstufen zur Verfügung, die hinsichtlich der ENU-induzierten Gewebeveränderungen untersucht wurden. Die Schwann-Zellen im Gewebeverband dieser Nerven, die im Gegensatz zu reifen Schwann-Zellen einen abgerundeten Zellkern aufwiesen sowie in haufenförmigen oder straßenähnlichen Formationen vorlagen, wurden als prämale identifiziert und einer Malignitätsskala von 1-4 zugeordnet.

Tendenzmäßig wurden bei jüngeren Tieren (<200 Tage alt) mehr höhergradige prämale Veränderungen gefunden mit einem durchschnittlichen Malignitätsgrad von 2,3, während bei älteren Tieren die Mehrheit der Nerven morphologisch unauffällig war. Das entspricht zum Teil den Beobachtungen, die bei den Nerven der ENU - behandelten euthymischen BDIV Ratten gemacht worden waren, bei denen die prämalen Schwann-Zellen bis zum Tag 100 nachzuweisen sind und ab diesem Zeitpunkt zu verschwinden beginnen (Kindler-Rohrborn et al., 2000).

In den Nerven von einigen der ältesten thymektomierten Tiere wurden jedoch immer wieder prämale höhergradige Veränderungen vorgefunden, so dass der durchschnittliche Malignitätsgrad des Gewebes von 200 - 300 Tage alten Tieren 1,9 betrug. Diese Werte könnten sogar noch höher liegen, da in der vorliegenden Studie die Nerven nicht vollständig untersucht wurden, so dass kleinere

prämaligne Herde, die nicht den gesamten Querschnitt des Nerven ausfüllten, unter Umständen nicht entdeckt wurden.

Für den Zeitraum nach 180 Tagen gibt es wenig Vergleichswerte von ENU behandelten euthymischen BDIV Ratten. Aus Studien unserer Arbeitsgruppe zeigte sich jedoch, dass ab Tag 180 keine morphologischen Veränderungen in den Nerven dieser Tiere mehr nachweisbar sind (Kindler-Rohrborn et al., 2000), während 12 von 25 Nerven 300 - 600 Tage alter ENU behandelter thymektomierter BDIV Ratten (aktuelle Studie) prämaligne Veränderungen mit einem Malignitätsgrad ≥ 2 aufwiesen. Das könnte bedeuten, dass durch die Einschränkung der Immunkompetenz bei BDIV Ratten die prämaligen Gewebeveränderungen den Tumorabwehrmechanismen entkommen und in den *N. trigemini* unentdeckt persistieren können.

Es ist bekannt, dass die Proliferation der Tumorzellen durch das Immunsystem kontrolliert werden kann und sich diese solange im Gleichgewicht befinden bis es einer Tumorzelle gelingt sich der Kontrolle des Immunsystem zu entziehen und sich zu einem malignen zu Tumor entwickeln (Koebel et al., 2007).

Die Tatsache, dass in der Hälfte der *N. trigemini* thymektomierter BDIV Ratten, die keine MPNST entwickelten, keine prämaligen Schwann-Zellen nachzuweisen waren, spricht dafür, dass es neben den T-Zellen weitere resistenzvermittelnde Faktoren gibt. Vorstellbar wären andere Immuneffektorzellen (Makrophagen, B-Lymphozyten etc.) bzw., dass deren Interaktion mit den T-Lymphozyten dazu notwendig ist, eine effiziente Tumorabwehr zu gewährleisten. Die Beteiligung von Immuneffektorzellen bei der Eliminierung von Tumorzellen wurde schon mehrfach beschrieben. Es wurde gezeigt, dass durch T-Zellen aktivierte Makrophagen Kolon-Tumorzellen abtöten können (Bonnotte et al., 2001). Mäuse in denen keine T- und B-Lymphozyten und auch keine natürlichen Killerzellen gebildet werden, entwickeln nach Kanzerogenexposition häufiger und schneller Tumoren als Wildtyp-Mäuse (Shankaran et al., 2001).

Um zu erfahren, ob in thymektomierten BDIV Ratten nicht nur *Neu/ErbB2* -mutante sondern auch prämaligne Schwann-Zellen mit anderen Mutationen entstehen, sollten im nächsten Schritt die prämaligen Schwann-Zellen, die sich erfahrungsgemäß im Bereich der Hirn-Nerven-Grenze des *N. trigeminus* befinden, auf das Vorhandensein der *Neu/ErbB2* Mutation untersucht werden.

Interessanterweise wurden *N. trigemini* gefunden, bei denen aufgrund ihrer Histologie eindeutig Tumorstadien bzw. MPNST vorlagen, die mutierten Allele des *Neu/ErbB2* Gens bei diesen *N. trigemini* jedoch nicht oder in geringem Maße nachzuweisen waren.

Die Behandlung mit der krebsauslösenden Substanz ENU führt durch die Alkylierung der gesamten DNA dazu, dass Punktmutationen mit einer Frequenz von ca. 1/10000 Nukleotiden im gesamten Genom auftreten, von denen jedoch ein großer Teil repariert wird (Druckrey et al., 1966; Goth und Rajewsky, 1974). Das bedeutet, dass in der DNA jeder Zelle eines behandelten Tiers eine Reihe von Mutationen existiert und dass es neben den *Neu/ErbB2*-mutanten Schwann-Zellen im *N. trigeminus* Schwann-Zellen geben muss, in denen andere proliferationsfördernde Gene in einer Weise verändert sein müssen, dass sie ebenfalls einen Selektionsvorteil vermitteln. Solche Schwann-Zellen könnten sich dann ebenfalls ungehindert vermehren und sind als prä maligne anzusehen.

Da Tumoren ohne die *Neu/ErbB2* Mutation bei BDIX Ratten nie beobachtet worden sind und auch die äußerst wenigen verfügbaren MPNST von BDIV Ratten ebenfalls im *Neu/ErbB2* Gen mutiert waren (Rajewsky, unveröffentlichte Ergebnisse), ist es wahrscheinlich, dass die prä malignen Schwann-Zellen ohne die *Neu/ErbB2* Mutation in immunkompetenten Tieren beider Stämmen erfolgreich eliminiert werden können. BDIV Ratten scheinen darüber hinaus im Gegensatz zu BDIX Ratten zusätzlich in der Lage zu sein die *Neu/ErbB2*-mutanten prä malignen Schwann-Zellen ab einem Alter von 90 Tagen beseitigen zu können.

Vorstellbar wäre, dass die *Neu/ErbB2*-mutanten Schwann-Zellen vom intakten Immunsystem der BDIV Ratte erkannt und eliminiert werden könnten. Sobald BDIV Ratten jedoch z.B. durch die Thymektomie einen Teil ihrer Immunkompetenz eingebüßt haben, scheinen sich sowohl die *Neu/ErbB2*-mutanten Schwann-Zellen als auch prä maligne Schwann-Zellen mit anderen genetischen Veränderungen in den *N. trigemini* MPNST zu bilden.

Weitere Untersuchungen beschäftigten sich damit die oben beschriebenen prä malignen Schwann-Zellen in den *N. trigemini* der ENU behandelten thymektomierten sowie euthymischen BDIV Ratten unabhängig von ihrer Lokalisation und ohne oder mit sehr wenig Kontamination durch andere Zellen im Hinblick auf die *Neu/ErbB2* Mutation zu analysieren. Sie wurden im Zellverband von 50 – 100 Zellen durch lasergestützte Mikrodisektion aus dem

Gewebeverband der *N. trigemini* isoliert. Der Nachweis der *Neu/ErbB2* Mutation war auch mit den entsprechend kleinen Mengen an DNA möglich.

Es konnte bestätigt werden, dass nur ein Teil der morphologisch als prämaligne anzusehenden Schwann-Zell-Läsionen in den Nerven beider Tiergruppen die Mutation aufwies. Die Tatsache, dass die durchschnittlichen Prozentsätze der mutierten Allele in den mikrodissezierten Zellverbänden thymektomierter bzw. euthymischer Ratten 35% bzw. 25% betrugen, lässt darauf schließen, dass nur ein Teil der Zellen die Mutation aufwies. Diese Analyse bestätigt erneut die Beobachtung, dass unter den histomorphologisch eindeutig als prämaligne identifizierten Läsionen in den *N. trigemini* thymektomierter BDIV Ratten auch Zellgruppierungen ohne die *Neu/ErbB2* Mutation zu finden sind. Darüber hinaus wird klar, dass sich auch in den Nerven euthymischer BDIV Ratten Schwann-Zellen mit einer prämaligen Morphologie befinden, die die Mutation nicht tragen, obwohl alle bisher untersuchten BDIV Tumoren im *Neu/ErbB2* Gen mutiert sind. Es ist daher anzunehmen, dass die Bedingungen im Gewebe thymektomierter Tiere für die Expansion prämaligener Schwann-Zellen mit anderen genetischen Aberrationen förderlich sind.

Ähnliche Phänomene während der chemisch induzierten Kanzerogenese im Tiermodell, nämlich, dass die Gewebeumgebung, das sogenannte „Microenvironment“ Einfluss auf den histologischen Typ des Tumors sowie den Mutationsstatus hat, wurden bereits beschrieben. Beispielsweise wurde in den Lebertumoren von Mäusen, die nur mit Diethylnitrosamin behandelt wurden, ein 30 % Auftreten von *Ha-Ras* Mutationen und ein Fehlen von Mutationen im β *Catenin* Gen beobachtet. Wenn man die Mäuse dagegen neben Diethylnitrosamin zusätzlich mit Phenobarbital behandelte, fehlte die *Ha-Ras* Mutation, die β - *Catenin* Mutation fand man jedoch in 80% der Lebertumoren. Die Autoren deuteten die Ergebnisse so, dass Phenobarbital vermutlich durch positive und negative Selektion der mutierten Zellen die Prävalenz von Mutationen in den beiden Genen beeinflusst (Aydinlik et al., 2001). Vermutlich initiiert Diethylnitrosamin diese beiden und weitere Mutationen, jedoch können in der Leber von Tieren, die mit Phenobarbital behandelt wurden, hauptsächlich Zellen mit der Mutation im β – *Catenin* Gen expandieren, während die Bedingungen in der Leber von Tieren, die kein Phenobarbital erhalten hatten, die Proliferation der im *Ha-Ras* Gen mutierten Zellen begünstigt war.

2. Charakterisierung der prämaligen und malignen Schwann-Zellen anhand der Expression des Ngfr und der Anwesenheit der *Neu/ErbB2* Mutation

Die Analysen ergaben, dass nicht alle morphologisch als prämalig anzusehenden Schwann-Zellen die *Neu/ErbB2* Mutation aufweisen, die bis dato ein diagnostisches Kriterium für MPNST euthymischer BD Ratten darstellte. Deswegen sollte geklärt werden, ob die Expression eines spezifischen Markerproteins in diesen Schwann-Zellen eine stärkere Korrelation mit der Anwesenheit der Mutation aufweisen würde als die histomorphologischen Kriterien. Im Rahmen der Suche nach Markerproteinen zeigte unsere Arbeitsgruppe, dass Schwann-Zellen mit entarteter Morphologie während der ENU induzierten Kanzerogenese bei BDIX und BDIV Ratten sowie die daraus resultierenden MPNST den niedrig affinen Nervenwachstumsfaktorrezeptor (Ngfr) exprimieren. Dieses Protein stellt während der Entwicklung des zentralen Nervensystems einen Marker für unreife Schwann-Zellen dar (Jessen und Mirsky, 2005).

In meiner Arbeit untersuchte ich durch lasergestützte Mikrodissektion von Schwann-Zellen, die mit einem Antikörper gegen Ngfr immunhistochemisch gefärbt worden waren, ob und inwieweit die Ngfr Expression der prämaligen und malignen Schwann-Zellen in immunkompetenten und in thymektomierten Ratten mit der Anwesenheit der *Neu/ErbB2* Mutation, die primär als Marker für diese Zellen galt, korreliert.

Es zeigte sich, dass in den *N. trigemini* ENU behandelten euthymischen BDIV Ratten eine enge Korrelation zwischen Ngfr Expression und dem Mutationsstatus bestand: je nach Stärke der Ngfr Expression stieg sowohl die Anzahl der mikrodissezierten Gewebeabschnitte in denen die *Neu/ErbB2* Mutation nachweisbar war (70-100%) als auch der durchschnittliche Prozentsatz der mutierten Allele pro Gewebeareal (10-50%). Dadurch, dass zumindest prämalig Schwann-Zellen ein mutiertes und ein nicht mutiertes *Neu/ErbB2* Allel haben, entspricht ein Wert von 50% mutiertem Allel 100% mutierten heterozygoten Zellen. Der Prozentsatz der *Neu/ErbB2*-mutierten Allele unter 50% zeigt, dass nicht alle Schwann-Zellen eines Ngfr exprimierenden Gewebeverbands die *Neu/ErbB2* Mutation trugen (Abb. 11 B). Dies erklärt sich auch dadurch, dass sich in den mikrodissezierten Arealen außer prämaligen auch einige differenzierte Schwann-Zellen und Stromazellen wie Fibroblasten, Immunzellen, und Gefäßendothelien

befinden können, die nicht im *Neu/ErbB2* Gen mutiert sind und damit den Prozentsatz mutierter Allele senken. Auch in 50% der nicht Ngfr exprimierenden morphologisch prämaligen Zellverbänden war die Mutation vorhanden. Der niedrige durchschnittliche Prozentsatz von <10% mutierten Allelen zeigt jedoch, dass nur vereinzelte Zellen in diesen Gewebeabschnitten mutiert sind.

Die enge Korrelation, die wir bei den euthymischen BDIV Ratten beobachten, ist in den *N. trigemini* ENU behandelten thymektomierten BDIV Ratten entkoppelt. Unabhängig von der Stärke der Ngfr Expression weisen 36-50% der entsprechenden Zellverbände die *Neu/ErbB2* Mutation auf. Jedoch sind in all diesen Arealen nur 5 - 10% der Allele mutiert (Abb. 11 A). Das Ergebnis für morphologisch als prämalig anzusehende Zellverbände ohne Ngfr Expression ist nicht signifikant unterschiedlich. Dieser Befund spricht ebenfalls dafür, dass in den Nerven thymektomierter BDIV Ratten vermutlich als Folge der T-Zell-Depletion überwiegend prämalig Schwann-Zellen mit anderen genetischen Veränderungen expandieren, die dennoch Ngfr exprimieren.

In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob vollständig maligne Schwann-Zellen aus MPNST eine Korrelation zwischen Ngfr Expression und der *Neu/ErbB2* Mutation zeigen.

Bei den MPNST thymektomierter BDIV Ratten zeigte sich erwartungsgemäß eine verhältnismäßig schwache Korrelation: 35 % der Ngfr stark und 20 % der Ngfr schwach exprimierenden malignen Schwann-Zellen wiesen die *Neu/ErbB2* Mutation auf. Bei diesen Tumorzellen handelte es sich ebenso wie bei den prämaligen Schwann-Zellen, um eine Mischpopulation mit Zellen, die andere genetische Aberrationen aufweisen, da der durchschnittliche Anteil der mutierten Allele bei 25% bzw. 10% lag (Abb. 12 A). Verglichen mit den prämaligen Schwann-Zellen findet man hier jedoch eher eine Anreicherung *Neu/ErbB2*-mutierter Ngfr exprimierender Zellen.

MPNST, die in anderen immunkompetenten Rattenstämmen entstanden waren, exprimierten ebenfalls Ngfr. Dabei beobachtete ich in den Tumoren der (BDIV x BDIX) x BDIX Rückkreuzung sowie der BDIX Ratten eine besonders starke Expression. Die Mutation wurde in 80% der Ngfr stark und 60% der etwas schwächer exprimierenden Tumorzellen der Rückkreuzungstiere nachgewiesen, wobei 70%, bzw. 50% der Allele mutiert waren (Abb. 12 B).

Während der ENU-induzierten Kanzerogenese in den *N. trigemini* der BD Rattenstämme ist nach der Mutation des *Neu/ErbB2* Gens ein loss of heterozygosity (LOH) auf dem Chromosom 10 ein notwendiger Schritt (Kindler-Rohrborn et al., 2000). Dieser LOH umfasst auch das *Neu/ErbB2* Gen, so dass in den meisten MPNST wie auch in meiner Studie > 50 % mutierte Allele gefunden werden. Da diese Tumoren einen normalen Karyotyp haben können, kann dieser Befund nur durch Verlust eines Chromosom 10 mit Verdopplung des verbleibenden Chromosoms (uniparentale Disomie) oder bei einem kleineren LOH durch mitotische Rekombination zu Stande kommen (Nikitin et al., 1991; Kindler-Rohrborn et al., 1999). Bei den F₁-Hybriden kommt es während der ENU induzierten Kanzerogenese immer zum Verlust des BDIV-Chromosoms oder Chromosomenabschnitts, so dass davon ausgegangen werden muss, dass der Verlust des BDIV Allels eines in dem entsprechenden Abschnitt liegenden Gens einen Selektionsvorteil für die Tumorzellen darstellt (Kindler-Rohrborn et al., 1999). Es ist anzunehmen, dass es bei den MPNST der Rückkreuzungshybride ebenfalls zu einem LOH gekommen ist, da der Prozentsatz der mutierten Allele bei den Ngfr stark exprimierenden Arealen bei ca. 70% liegt.

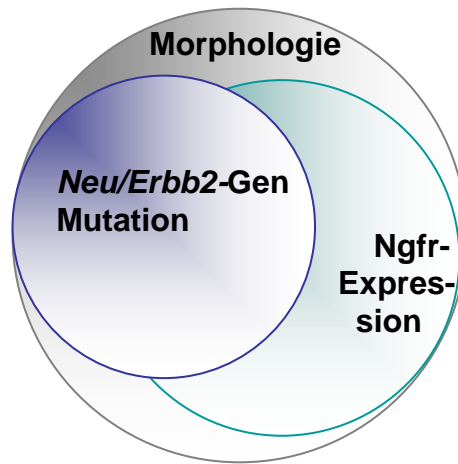
Es ist bekannt, dass sich das *Ngfr* Gen auf Chromosom 10 nahe dem *Neu/ErbB2* Gen befindet. Da bei den Rückkreuzungshybriden ein Chromosom von der BDIX Ratte stammt und das andere Chromosom eine zufällige Mischung aus BDIV und BDIX Anteilen ist, ist es nahe liegend, dass die meisten malignen Schwann-Zellen der Rückkreuzungshybride entweder primär oder durch LOH über zwei BDIX Allele verfügen. Es ist vorstellbar, dass durch das BDIX Allel des *Ngfr* Gens das Protein stärker exprimiert wird als durch das BDIV Allel. Das würde erklären, weswegen die stark Ngfr exprimierenden Schwann-Zellen in den MPNST der Rückkreuzungshybride durchschnittlich 70% mutierte Allele des *NeuErbB2* Gens haben, während die schwächer exprimierende Tumorzellen vermutlich noch keinen LOH aufweisen und deswegen nur ca. 50 % mutierte Allele in diesen Schwann-Zellen nachweisbar sind und diese zum Teil das BDIV Allel des Ngfr Gens tragen, das zu einer schwächeren Ngfr Expression führt.

Ngfr ist ein Protein aus der Superfamilie der Tumornekrosefaktorrezeptoren, das je nach Gewebe und Kontext und der Anwesenheit von Co-Rezeptoren zum Teil gegensätzliche Wirkungen auf eine Reihe verschiedener Zellfunktionen wie z.B. Überleben, Proliferation und Motilität ausübt (Li et al., 2010; Nakagawara, 2001).

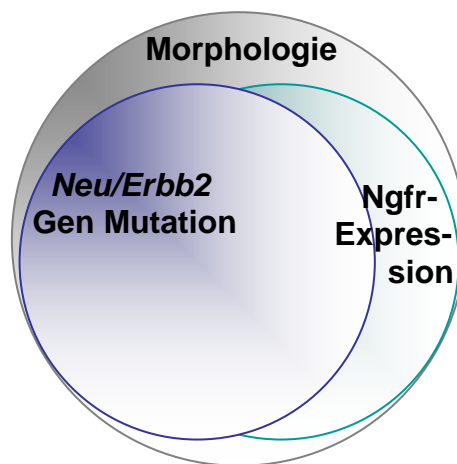
Ngfr wird in frühen Schwann-Vorläuferzellen jedoch nicht in differenzierten Schwann-Zellen exprimiert (Jessen und Mirsky, 2005) und übt sowohl hemmende als auch fördernde Effekte auf die Migration dieser Zellen aus (Anton et al., 1994; Yamauchi et al., 2004; Bentley und Lee, 2000). Es ist darüber hinaus bekannt, dass das Protein die Invasivität von Gliomzellen reguliert (Johnston et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die meisten Ngfr exprimierenden prämaligen Schwann-Zellen der euthymischen BDIV Ratten die *Neu/ErbB2* Mutation aufweisen (siehe Abb.11). Bei diesen Tieren könnte Ngfr als Marker für die *Neu/ErbB2*-mutierten Schwann-Zellen genutzt werden, dies würde das Erkennen dieser Zellen während der Kanzerogenese in den *N. trigemini* der BDIV Ratten erleichtern. Bei den thymektomierten BDIV Ratten fanden sich jedoch erwartungsgemäß (prä)maligne Schwann-Zellen sowohl mit der Mutation im *Neu/ErbB2* Gen als auch mit anderen genetischen Aberrationen, die Ngfr exprimierten. Daher ist Ngfr bei den thymektomierten BDIV Ratten als ein Marker prämaligener Schwann-Zellen unabhängig von der die Kanzerogenese initiierenden genetischen Veränderungen anzusehen.

Damit bietet sich die Möglichkeit, mit Hilfe dieses Markermoleküls Abläufe während der ENU induzierten Kanzerogenese der BD-Ratten besser analysieren und verstehen zu können.

BDIV



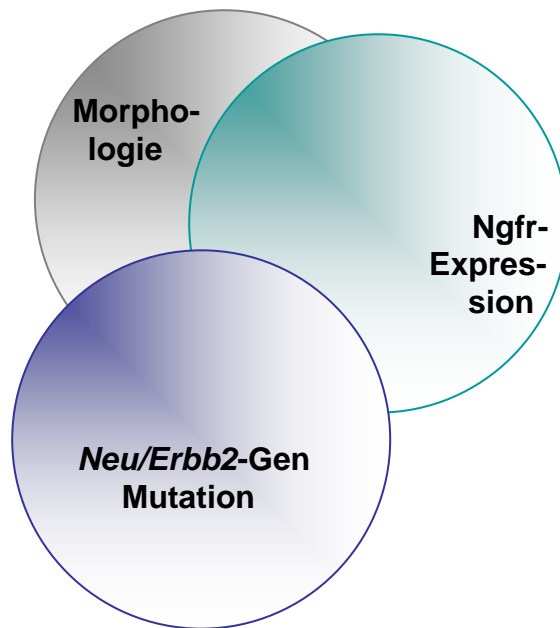
A thymektomiert



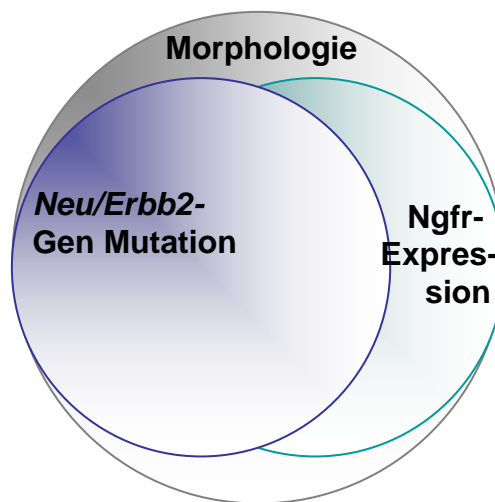
B euthymisch

Abb. 11 Grobschematische Darstellung der Überschneidungen von Zellsubpopulationen mit verschiedenen Charakteristika (Morphologie, Ngfr-Expression *Neu/ErbB2* Mutation) untereinander bei prämaligen Schwann-Zellen der euthymischen (A) und thymektomierten (B) BDIV Ratten

MPNST



A BDIV thymektomiert



B Rückkreuzungshybride

Abb. 12 Grobschematische Darstellung der Überschneidungen von Zellsubpopulationen mit verschiedenen Charakteristika (Morphologie, Ngfr-Expression, Vorhandensein der *Neu/ErbB2* Mutation) untereinander bei malignen Schwann-Zellen der MPNST thymektomierter BDIV Ratten (A) und bei Rückkreuzungshybriden (B)

V. ZUSAMMENFASSUNG

Über 90% der Ratten des tumorsensiblen BDIX Stamms entwickeln nach einmaliger Gabe des Karzinogens Ethylnitrosoharnstoff (ENU) am 1. Postnataltag maligne periphere Nervenscheidentumoren (MPNST) des *N. trigeminus*. Ratten des BDIV Stamms sind dagegen nahezu vollständig tumorresistent. Dennoch sind schon kurz nach Kanzerogenexposition in den *N. trigemini* beider Stämme prä maligne Schwann-Zellen nachzuweisen, die eine Punktmutation im *Neu/ErbB2* Gen tragen. Diese Zellen werden bei der resistenten BDIV Ratte ab Tag 90 wieder eliminiert, woran das Immunsystem beteiligt zu sein scheint, da nach Entfernung des Thymus ca. 20% der BDIV Ratten MPNST ausbildeten. In der vorliegenden Arbeit wurden die Schwann-Zellen der immunkompetenten sowie thymektomierten BD Ratten anhand molekularer Marker untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in etwa der Hälfte der thymektomierten Tiere Zellen mit prä maligner Morphologie nachweisbar waren, die im Vergleich zu euthymischen Ratten eindeutig länger persistierten. Darüber hinaus scheint die eingeschränkte Immunkompetenz die Expansion prä maligner Schwann-Zellen mit anderen genetischen Aberrationen zuzulassen, da nicht alle prä malignen Schwann-Zellverbände bzw. MPNST die *Neu/ErbB2* Mutation trugen. Andererseits deutet die Tatsache, dass ca. 50% der Nerven frei von Veränderungen waren und, dass in einigen *N. trigemini* der älteren thymektomierten BDIV Ratten prä maligne Schwann-Zellen nachweisbar waren, aus denen – zumindest für einen längeren Zeitraum - keine Tumoren entstanden sind, darauf hin, dass es neben den T-Zellen weitere resistenzvermittelnde Faktoren gibt, die möglicherweise verbliebene prä maligne Zellen eliminieren oder in ihrer Progression zum malignen Phänotyp stoppen können. Weiterhin wurde versucht prä maligne und maligne Schwann-Zellen durch die Expression des niedrig affinen Nervenwachstumsfaktorrezeptors (Ngfr) zu charakterisieren. Es zeigte sich, dass bei den prä malignen Zellen in den *N. trigemini* ENU behandelte euthymische BDIV Ratten eine enge Korrelation zwischen Ngfr Expression und der *Neu/ErbB2* Mutation besteht. Das gleiche galt für MPNST, die in (BDIV x BDIX) x BDIX Hybriden entstanden sind. Diese Korrelation ist jedoch bei den prä malignen Zellen in den *N. trigemini* ENU-behandelte thymektomierter BDIV Ratten sowie in den daraus resultierenden MPNST durch die Anwesenheit (prä) maligner Zellen mit anderen Mutationen entkoppelt. Ngfr könnte daher als potentieller durch Immunhistochemie detektierbarer Marker die in situ Früherkennung (prä) maligner Schwann-Zellen mit und ohne die *Neu/ErbB2* Mutation im *N. trigeminus* ermöglichen, wodurch die Abläufe während der ENU induzierten Kanzerogenese der BD Ratten sowie die Rolle des Immunsystems besser analysiert und verstanden werden könnten.

VI: LITERATURVERZEICHNIS

1. Anton, E. S., Weskamp, G., Reichardt, L. F., Matthew, W. D. (1994):
Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote schwann cell migration.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 91, 2795-2799.
2. Aydinlik, H., Nguyen, T. D., Moennikes, O., Buchmann, A., Schwarz, M. (2001):
Selective pressure during tumor promotion by phenobarbital leads to clonal
outgrowth of beta-catenin-mutated mouse liver tumors.
Oncogene. 20, 7812-7816.
3. Bargmann, C. I., Hung, M. C., Weinberg, R. A. (1986):
The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein.
Nature. 319, 226-230.
4. Bartek, J., Bartkova, J., Lukas, J. (1997):
The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer.
Exp. Cell. Res. 237, 1-6.
5. Bentley, C. A., Lee, K. F. (2000):
p75 is important for axon growth and schwann cell migration during development.
J. Neurosci. 20, 7706-7715.
6. Bonnotte, B., Larmonier, N., Favre, N., Fromentin, A., Moutet, M., Martin, M.,
Gurbuxani, S., Solary, E., Chauffert, B., Martin, F. (2001):
Identification of tumor-infiltrating macrophages as the killers of tumor cells after
immunization in a rat model system.
J. Immunol. 167, 5077-5083.
7. Bresalier, R. S. (1997):
The gatekeeper has many keys: dissecting the function of the APC gene.
Gastroenterology. 113, 2009-2010.

8. Brown, M. A. (1997):
Tumor suppressor genes and human cancer.
Adv. Genet. 36, 45-135.
9. Druckrey, H. (1973):
Specific carcinogenic and teratogenic effects of indirect alkylating methyl and ethyl compounds and their dependency on stages of ontogenic developments.
Xenobiotica. 3, 271-303.
10. Druckrey, H., Ivankovic, S., Preussmann, R. (1966):
Teratogenic and carcinogenic effects in the offspring after single injection of ethylnitrosourea to pregnant rats.
Nature. 210, 1378-1379.
11. Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D. M. (2010):
Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: Globocan 2008.
Int. J. Cancer. 127, 2893-2917.
12. Gering, K. M., Marx, J. A., Lennartz, K., Fischer, C., Rajewsky, M. F., Kindler-Rohrborn, A. (2006):
The interaction mode of premalignant schwann and immune effector cells during chemically induced carcinogenesis in the rat peripheral nervous system is strongly influenced by genetic background.
Cancer Res. 66, 4708-4714.
13. Goth, R., Rajewsky, M. F. (1974):
Persistence of O6-ethylguanine in rat-brain DNA: correlation with nervous system-specific carcinogenesis by ethylnitrosourea.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 71, 639-643.
14. Hung, M. C., Lau, Y. K. (1999):
Basic science of HER-2/neu: a review.
Semin. Oncol. 26, 51-59.

15. Jessen, K. R., Mirsky, R. (2005):

The origin and development of glial cells in peripheral nerves.

Nat. Rev. Neurosci. 6, 671-682.

16. Johnston, A. L., Lun, X., Rahn, J. J., Liacini, A., Wang, L., Hamilton, M. G., Parney, I. F., Hempstead, B. L., Robbins, S. M., Forsyth, P. A., Senger, D. L. (2007):

The p75 neurotrophin receptor is a central regulator of glioma invasion.

PLoS. Biol. 5, 212.

17. Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A. (2012):

Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Aus.

Berlin: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft

der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.;

18. Kindler-Rohrborn, A., Kind, A. B., Koelsch, B. U., Fischer, C., Rajewsky, M. F. (2000):

Suppression of ethylnitrosourea-induced schwannoma development involves elimination of neu/erbB-2 mutant premalignant cells in the resistant BDIV rat strain.

Cancer Res. 60, 4756-4760.

19. Kindler-Rohrborn, A., Kolsch, B. U., Buslei, R., Zabel, S., Wiestler, O. D., Rajewsky, M. F. (2000):

Allele-specific losses of heterozygosity on chromosomes 1 and 17 revealed by whole genome scan of ethylnitrosourea-induced gliomas of BDIX x BDIV hybrid rats.

Mol. Carcinog. 27, 149.

20. Kindler-Rohrborn, A., Kolsch, B. U., Fischer, C., Held, S., Rajewsky, M. F. (1999):

EthylNitrosourea-induced development of malignant schwannomas in the rat: two distinct loci on chromosome of 10 involved in tumor susceptibility and oncogenesis.

Cancer Res. 59, 1109-1114.

21. Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1997):

Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers.

Nature. 386, 761- 763.

22. Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Old, L. J., Smyth, M. J., Schreiber, R. D. (2007):

Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state.

Nature. 450, 903-907.

23. Korkola, J. E., Archer, M. C. (1999):

Resistance to mammary tumorigenesis in copenhagen rats is associated with the loss of preneoplastic lesions.

Carcinogenesis. 20, 221-227.

24. Li, C., Macdonald, J. I., Hryciw, T., Meakin, S. O. (2010):

Nerve growth factor activation of the TrkA receptor induces cell death, by macropinocytosis, in medulloblastoma Daoy cells.

J. Neurochem. 112, 882-899.

25. Marx, J. A., Rohrborn, A. J., Koelsch, B. U., Fischer, C., Herrmann, T., Pietsch, T., Rajewsky, M. F., Kindler-Rohrborn, A. (2009):

Ablation of T cell immunity differentially influences tumor risk in inbred BD rat strains.

Cancer. Immunol. Immunother. 58, 1287-1295.

26. Nakagawara, A. (2001):
Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development.
Cancer Lett. 169, 107-114.
27. Nikitin, A., Ballering, L. A., Lyons, J., Rajewsky, M. F. (1991):
Early mutation of the neu (erbB-2) gene during ethylnitrosourea-induced
oncogenesis in the rat schwann cell lineage.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 88, 9939-9943.
28. Ponder, B. A. (1990):
Inherited predisposition to cancer.
Trends Genet. 6, 213-218.
29. Rajewsky, M. F., Augenlicht, L. H., Biessmann, H., Goth, R., Hülser, D. F.,
Laerum, O. D., Lomakina, L. Y. (1977):
Nervous-system-specific carcinogenesis by ethylnitrosourea in the rat: molecular
and cellular aspects. In: Hiatt, H. H., Watson, J. D., Winston, J. A. (Eds.): Origins
of Human Cancer. S. 709-726. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor
Laboratory Press.
30. Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J.,
Schreiber, R. D. (2001):
IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape
tumour immunogenicity.
Nature. 410, 1107-1111.
31. Swenberg, J. A., Clendenon, N., Denlinger, R., Gordon, W. A. (1975):
Sequential development of ethylnitrosourea-induced neurinomas: morphology,
biochemistry, and transplantability.
J. Natl. Cancer Inst. 55, 147-152.
32. Weinberg, R. A. (1995):
The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes.
Ann. N Y. Acad. Sci. 758, 331-338.

33. Wiesmuller, L., Wittinghofer, F. (1994):
Signal transduction pathways involving ras. Mini review.
Cell Signal. 6, 247-267.
34. Yamauchi, J., Chan, J. R., Shooter, E. M. (2004):
Neurotrophins regulate schwann cell migration by activating divergent signaling
pathways dependent on Rho GTPases.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 101, 8774-8779.
35. Zheng, L., Li, S., Boyer, T. G., Lee, W. H. (2000):
Lessons learned from BRCA1 and BRCA2.
Oncogene. 19, 6159-6175.

VII. ANHANG: Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A. bidest	Zweifach destilliertes entmineralisiertes Wasser
AB-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BD	Berlin-Druckrey
bp	Basenpaare
CD	Cluster of Differentiation
DAB	3,3-Diaminobenzidine
dATP	2´-Desoxyadenosin-5`-Triphosphat
dCTP	2´-Desoxycytidin-5`-Triphosphat
dest.	Destiliert
dGTP	2´-Desoxyguanosin-5`-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	2´-Desoxythymidin-5`-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
NEU	N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff
G	Gramm
LOH	Loss of heterozygosity
M	Molar
Mg	Milligramm
ml	Milliliter
Mm	Millimeter
mM	Millimolar
min	Minuten
MPNST	Maligner peripherer Nervenscheidentumor
<i>N.trigeminus /N.trigemini</i>	<i>Nervus trigeminus / Nervi trigemini</i>

Abkürzung	Bedeutung
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
Ngf	Nervenwachstumsfaktor
Ngfr	Nervenwachstumsfaktorrezeptor
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure
sek	Sekunden
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',Tetramethylethylendiamin
U	Einheiten (Units)
U/min.	Umdrehungen/Minute
ZNS	Zentrales Nervensystem

VIII. DANKSAGUNGEN

Ganz besonders möchte ich Frau Priv. Doz. Dr. Kindler – Röhrborn für die wundervolle Betreuung, wissenschaftliche Unterstützung, interessante Diskussionen und motivierende Worte danken.

Herrn Dr. Kölsch danke ich für die geduldige Einarbeitung in die komplizierte Methodik der Molekularpathologie und Aufmunterung, wenn es mal nicht geklappt hat.

Bei Frau Kutritz möchte ich mich für die Einarbeitung in die immunhistochemische Methodik und die freundliche Hilfe im Labor bedanken.

Bei meinem Freund Tim möchte ich mich für die jahrelange Geduld und Hilfsbereitschaft im Umgang mit Programmen und Computer bedanken.

IX. LEBENSLAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

